



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ C12N 15/19, 15/85, 15/86, 15/88, 5/10, C12Q 1/68, C07K 14/52, 14/715, 14/73, 16/24, 16/28, A61K 38/17, 38/19, 48/00, G01N 33/53	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/04698 (43) Date de publication internationale: 5 février 1998 (05.02.98)
---	----	--

<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/01402</p> <p>(22) Date de dépôt international: 25 juillet 1997 (25.07.97)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 96/09477 26 juillet 1996 (26.07.96) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 25-28, rue du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15 (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): ARENZANA-SEISDEDOS, Fernando [ES/FR]; 18, rue de Rushmor, F-92190 Meudon (FR). VIRELIZIER, Jean-Louis [FR/FR]; 25, rue du Moulin de la Vierge, F-75014 Paris (FR). BAGGIOLINI, Marco [CH/CH]; Optingenstrasse 53, CH-3013 Beme (CH). MOSER, Bernhard [CH/CH]; Flurweg 7, CH-3066 Stettlen (CH). CLARK-LEWIS, Ian [CA/CA]; 423 22 30 Acadia Road, Vancouver, BC V6T 1Z3 (CA).</p> <p>(74) Mandataires: PLASSERAUD, Yves etc.; Ernest Gutmann-Yves Plasseraud S.A., 3, rue Chauveau Lagarde, F-75008 Paris (FR).</p>	<p>(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasiatique (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</p>
---	---

(54) Title: USE OF A LESTR/FUSIN/CXCR4 RECEPTOR LIGAND CHEMOKINE (SDF-1) FOR TREATING OR PREVENTING HIV-TYPE VIRAL INFECTION

(54) Titre: UTILISATION D'UNE CHEMOKINE (SDF-1) LIGAND POUR LE RECEPTEUR DE LESTR/FUSIN/CXCR4 POUR PREVENIR OU TRAITER L'INFECTION PAR DES VIRUS DE TYPE VIH

(57) Abstract

An SDF-1 chemokine or a molecule derived therefrom for treating and/or preventing HIV retroviral infection is disclosed. Said chemokine consists of, is contained in or contains the following amino acid sequence: KPVSLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQEYLEKALN.

(57) Abrégé

L'invention a pour objet une chemokine SDF-1 ou molécule dérivée de SDF-1 pour la prévention et/ou le traitement d'une infection par un rétrovirus VIH, caractérisée en ce qu'elle répond à la séquence d'acides aminés ci-dessous ou en ce qu'elle est contenue dans cette séquence, ou en ce qu'elle contient cette séquence: KPVSLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQEYLEKALN.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovenie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

UTILISATION D'UNE CHEMOKINE (SDF-1) LIGAND POUR LE
RECEPTEUR DE LESTR/FUSIN/CXCR4 POUR PREVENIR OU TRAITER
L'INFECTION PAR DES VIRUS DE TYPE VIH

5 L'invention a pour objet l'utilisation d'un ligand du récepteur des chemokines LESTR, pour prévenir l'infection virale et/ou traiter des patients atteints d'infection virale, notamment infectés par un rétrovirus VIH.

10 Un récepteur potentiel humain de chemokine, LESTR cloné et séquencé (Loetscher M et al, J. Biol. Chem. 269, 232-237, 1994), a été récemment caractérisé comme ayant la capacité de fonctionner comme co-récepteur (appelé fusin) du récepteur CD4, pour des isolats de VIH (encore appelé HIV) ayant un tropisme pour les lymphocytes (souches lymphotropes) (Feng, Y. et al, B. J. Biol. Chem. 269, 232-237, 1994).

15 La molécule LESTR (leucocyte expressed -transmembrane domain receptor) est un récepteur orphelin ayant une structure similaire à celle des récepteurs connus de chemokines. En dépit de nombreux tests effectués sur un grand nombre de chemokines, le ligand de LESTR est resté jusqu'à présent non identifié (Loetscher, M. et al, J. Biol. Chem. 269, 232-237,
20 1994).

Connaissant la capacité des isolats de rétrovirus VIH de muter chez l'hôte infecté et compte tenu de l'observation faite selon laquelle les différents isolats étudiés sont susceptibles de reconnaître plusieurs récepteurs cellulaires chez l'hôte, distincts selon le stade de l'infection
25 (Weiss R.A., Science, vol. 272, June 28, 1996, p. 1885-1886), et en particulier le récepteur LESTR, les inventeurs ont recherché des molécules ayant une affinité pour le récepteur LESTR/fusin.

Des cellules exprimant le récepteur CD4 ont été rendues permissives à l'infection par des souches de HIV adaptées à l'infection de
30 lignées de cellules T, ces souches étant caractérisées par leur phénotype

inducteur de syncytium (SI). Ces souches ont été transfectées avec le cDNA de la molécule LESTR/fusin. A l'aide de ces cellules, les inventeurs ont caractérisé une chemokine humaine de la famille des chemokines CXC (Baggiolini M. et al, *Advances in immunology*, vol. 55, pages 97-176, 1994), à savoir le Facteur 1 dérivé des cellules stromales (SDF-1) ; SDF-1 est un ligand naturel pour le récepteur LESTR/fusin. La caractérisation de ce ligand permet de proposer de nouveaux moyens intéressants dans un but thérapeutique vis à vis d'infection par VIH ou à des fins de suivi de cette infection. L'identification d'un ligand de LESTR conduit en outre à suggérer une nouvelle terminologie pour la désignation de ce récepteur LESTR/fusin, l'appellation CXCR4, en accord avec la nomenclature adoptée pour les récepteurs des chemokines.

Les chemokines sont des molécules de la famille des cytokines, qui présentent des propriétés d'activation, en particulier de cellules de la famille des leucocytes faisant intervenir notamment des propriétés chemoattractives, des propriétés de mobilisation du calcium par augmentation du calcium intracellulaire et des propriétés de relargage d'enzymes (exocytose). Ces chemokines sont connues pour leur rôle éventuel en tant que médiateurs de l'inflammation.

20 Plusieurs chemokines ont été décrites par référence à leur structure et à leur affinité pour un ou plusieurs récepteurs et par référence à leurs propriétés biologiques, dans une publication de Baggiolini M. et al (Advances in Immunology (1994), vol. 55, pages 97-179).

Une publication de Wells T.N.C. et al (Journal of Leukocyte Biology,
25 vol. 59, January 1996, 53-60) décrit la structure tri-dimensionnelle de
plusieurs chemokines et leurs récepteurs spécifiques ou non.

De façon générale, ces chemokines sont caractérisées par la présence dans leur structure primaire, de résidus cystéine conservés (1 à 4 résidus notamment) sur la base desquels plusieurs sous-familles ont été distinguées selon la position des deux premières cystéines. Ces familles

comprennent celles des protéines CXC ou des protéines CC. La présence de ces résidus cystéine induit la formation de ponts disulfure.

La molécule SDF-1 murine a été décrite dans l'art antérieur comme étant un facteur pouvant être produit par les cellules stromales de la moelle osseuse et capable de stimuler la prolifération des progéniteurs de cellule B (Tashiro, K. et al, Science, 261, 600-603, 1993 et Nagasawa, T. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 2305-2309, 1994).

L'homologue humain (n° d'accès EMBL:U 16752) de SDF-1 murin a été cloné ensuite et caractérisé comme identique à SDF-1 murin. SDF-1 est une chemokine CXC comprenant un motif typique de 4 résidus cystéine, dans lequel les deux premiers résidus cystéine sont séparés par un acide aminé (Baggiolini, M. et al, Adv. Immunol. 55, 97-179, 1994).

En utilisant dans des tests d'inhibition des propriétés infectieuses de VIH, des protéines synthétisées, définies à partir de la séquence décrite de la chemokine SDF-1 humaine (EMBL n° U 16752), les inventeurs de la présente demande ont identifié la capacité de SDF-1 à inhiber in vitro l'infection par des rétrovirus VIH et ont défini de nouveaux produits (molécules dérivées de SDF-1) susceptibles d'intérêt dans le cadre de la prévention de l'infection par VIH et/ou du traitement de patients infectés par VIH.

Le terme « VIH » comprend les virus et rétrovirus humains ou animaux susceptibles d'induire une immunodéficience, tels que les rétrovirus connus sous les noms de VIH-1 et VIH-2 et notamment les différents isolats caractérisés jusqu'à ce jour, qu'il s'agisse d'isolats primaires (SI ou NSI), ou d'isolats modifiés pour répondre à des contraintes de culture in vitro (isolats SI).

A titre de référence pour chacun de ces isolats, on citera : pour des isolats primaires NSI, la souche JR-CSF (Koyanagi Y. et al, Science, 236, 819-822, 1987), pour des isolats primaires SI, la souche 89.6 (Doranz et al, Cell, 85, 1149-1153, 1996), pour des isolats ayant un tropisme pour les

lymphocytes T, souches NL4-3 et HIV-LAI (Adachi A. et al, J. Virol. 59, 284-291, 1986) ayant un tropisme pour les lymphocytes (phénotype SI).

Les inventeurs ont mis en évidence le rôle inhibiteur de SDF-1 sur l'infection de cellules par des isolats de type SI du rétrovirus VIH. La
5 capacité inhibitrice de SDF-1 serait donc dépendante du phénotype, en l'espèce SI, de la souche VIH infectieuse. Ceci n'exclut cependant pas, au contraire, l'utilisation des moyens de l'invention pour le traitement de patients asymptomatiques, infectés majoritairement par des souches de type primaires NSI. Il est en effet acquis que ces patients développent
10 néanmoins - pendant la phase asymptomatique de l'infection - également des souches de type SI dont l'émergence serait associée à l'entrée dans la phase clinique du SIDA.

L'invention concerne donc des molécules dérivées de la chemokine CXC, SDF-1, ainsi que l'utilisation de SDF-1 ou des molécules dérivées
15 seules ou avec d'autres agents thérapeutiques, pour la prévention et/ou le traitement d'infections par des rétrovirus VIH (VIH-1 ou VIH-2). Ces molécules dérivées de SDF-1, ainsi que SDF-1, constituent également des moyens pour réaliser pour un patient donné en particulier dans un test in vitro sur des cellules traitées par des chemokines en particulier SDF1 et
20 exprimant le co-récepteur LESTR/CXCR4 et le récepteur CD4, le suivi de l'infection par VIH et/ou celui des effets des traitements thérapeutiques mis en oeuvre.

L'invention permet par exemple de caractériser le phénotype d'isolats de rétrovirus VIH au cours de l'infection selon le stade de son
25 évolution et de mieux définir les modalités thérapeutiques, en particulier par l'utilisation d'une ou plusieurs chemokines ou de leurs molécules dérivées.

Selon l'invention, le tropisme pourra être défini par le type de corécepteur utilisé par exemple CKCCR5 ou CXCR4.

Outre l'utilisation des protéines SDF-1 ou de molécules dérivées de SDF-1, l'invention vise également l'utilisation des séquences de nucléotides codant pour SDF-1 ou pour des molécules dérivées, à des fins thérapeutiques.

5 L'invention a donc pour objet une chemokine SDF-1 ou une molécule dérivée de SDF-1 pour une utilisation pour la prévention et/ou le traitement d'une infection par un rétrovirus VIH.

Selon la présente demande, l'expression « prévention et/ou traitement d'une infection due à un rétrovirus VIH » s'applique à la prophylaxie ou à la thérapie, incluant le contrôle de l'évolution de l'infection y compris la prévention ou l'inhibition chez un hôte infecté, du développement de l'infection vers la phase clinique du SIDA (stade de l'infection succédant à la phase asymptomatique chez le patient) ou vers le stade fatal de la maladie. Avantageusement, cette expression englobe la
10 capacité de faire diminuer la charge virale chez l'hôte y compris jusqu'à l'élimination ou la mise en latence du virus chez le patient infecté.

Cette expression s'applique donc dans le cadre ci-dessus défini, à la prévention ou au traitement des effets observés ou latents chez un patient infecté par un rétrovirus VIH, que ces effets soient liés à la
20 répllication virale dans différents types cellulaires au cours du développement de l'infection et en particulier dans les cellules participant à l'immunité de l'hôte, notamment les lymphocytes du sang périphérique et des organes lymphoïdes (rate, ganglions...), tels que les lymphocytes T ou les macrophages, ou qu'il s'agisse des effets observés chez le patient
25 corrélativement à l'évolution de l'infection, tels que le développement ou d'infections dites opportunistes ou encore le développement des tumeurs précédant et/ou accompagnant le développement de la maladie SIDA.

Cette expression vise notamment la prévention ou la thérapie des manifestations que l'on peut observer chez un patient infecté par un VIH
30 telles que les déficits immunitaires ainsi que les réactions inflammatoires.

En d'autres termes, on entend dans le cadre de la présente invention par « infection par un VIH », le fait pour le rétrovirus d'infecter les cellules d'un hôte et de s'y répliquer, ainsi que les effets se manifestant chez un patient, avant le développement de la maladie SIDA ou lors du développement de cette maladie, qu'ils soient directement ou non reliés à la présence du virus, à la charge virale dans les cellules et/ou à l'émergence de souches mutantes. Ces souches mutantes sont par exemple des souches susceptibles d'induire la formation de syncytia (souche SI) dont l'émergence suit souvent une phase asymptomatique de l'infection, marquée par la présence entre autres de souches NSI, c'est à dire de souches non susceptibles d'induire la formation de syncytia.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, la chemokine SDF-1 ou molécule dérivée de SDF-1 pour la prévention et/ou le traitement d'une infection par un rétrovirus VIH, est caractérisée en ce qu'elle répond à la séquence d'acides aminés ci-dessous ou en ce qu'elle est contenue dans cette séquence, ou en ce qu'elle contient cette séquence :

KPVSLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCI
DPKCLKWIEYLEKALN.

La séquence ci-dessus décrite contient la partie de la chemokine SDF-1 active en tant qu'inhibiteur potentiel de l'infection par un VIH. Cette séquence polypeptidique peut être obtenue dans les cellules qui l'expriment, par clivage d'un peptide signal situé en amont dans la séquence codée par le cDNA décrit dans la banque de données EMBL sous la référence U 16752.

Cette séquence polypeptidique peut alternativement être préparée par synthèse chimique ou par recombinaison génétique dans des cellules eucaryotes ou procaryotes.

Le cas échéant, la séquence précédemment décrite sera utilisée sous une forme tronquée à son extrémité N- et/ou C-terminale, voire tronquée dans sa partie interne. Dans ces conditions, il conviendra de

vérifier, par exemple sur la base des tests proposés dans la partie expérimentale qui suit, que la forme tronquée de la molécule est active pour les propriétés antivirales recherchées vis-à-vis d'un rétrovirus VIH, notamment VIH-1 ou VIH-2.

5 Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la chemokine SDF-1 ou molécule dérivée est caractérisée en ce qu'elle contient l'enchaînement de nucléotides suivant :

KPVLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCI
DPKCLKWIEYLEKALN.

10 A titre d'exemple, cet enchaînement peut être précédé par un résidu méthionine (M) qui peut avoir l'avantage, tout en préservant les propriétés antivirales de la molécule obtenue, de limiter, voire d'inhiber les fonctions habituelles de transduction de signal de la chemokine SDF-1.

 Il doit être noté que toute molécule dérivée de SDF-1 utilisable dans
15 le cadre de l'invention doit avoir conservé la capacité de se lier au récepteur LESTR/CXCR4 humain, avantageusement avec une affinité voisine de l'affinité de liaison de la chemokine SDF-1 humaine pour le récepteur LESTR humain.

 Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la chemokine
20 SDF-1 ou molécule dérivée utilisée pour la prévention et/ou le traitement d'une infection par un rétrovirus VIH, est caractérisée en ce qu'elle est codée par un enchaînement de nucléotides contenu dans la séquence de nucléotides représentée à la figure 5. En particulier, la chemokine SDF-1 est le produit d'expression de la séquence contenue entre les nucléotides
25 144 et 344 ou 144 et 359 (extrémités comprises) de la séquence représentée à la figure 5.

 L'invention concerne à titre d'exemples, dans le cadre des définitions données précédemment, l'utilisation pour la prévention et/ou le traitement d'une infection par un rétrovirus VIH, d'une protéine répondant
30 en particulier à l'un des enchaînements d'acides aminés suivants :

MKPVSLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQV
CIDPKLKWIQEYLEKALN ou,

KPVSLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCI
DPKLKWIQEYLEKALNKRFBM ou,

- 5 MKPVSLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQV
CIDPKLKWIQEYLEKALNKRFBM.

L'invention a par ailleurs pour objet, un polypeptide caractérisé en ce qu'il est susceptible d'avoir une activité de prévention et/ou de traitement d'une infection par un rétrovirus VIH, et en ce qu'il contient une

10 molécule constituée par l'une des séquences d'acides aminés suivantes ou en ce qu'elle contient cette séquence :

KPVSLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCI
DPKLKWIQEYLEKALN ou ;

- 15 MKPVSLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQV
CIDPKLKWIQEYLEKALN ou ;

MKPVSLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQV
CIDPKLKWIQEYLEKALNKRFBM ou ;

KPVSLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCI
DPKLKWIQEYLEKALNKRFBM ou ;

- 20 une séquence d'acides aminés comprenant au moins 50% de résidus d'acides aminés identiques à ceux de l'enchaînement
KPVSLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCI
DPKLKWIQEYLEKALN, lorsqu'elle est alignée avec cet enchaînement, à l'exception des séquences d'acides aminés

- 25 KPVSLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCI
DPKLKWIQEYLEKALNKRFBM

et

MDAKWAVLALVLAALCISDGKPVSLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNT
PNCALQIVARLKNNNRQVCI DPKLKWIQEYLEKALNK

et

MDAKVVAVLALVLAALCISDGKPVSLSYRCPCRFFESHARANVKHLKILNT
PNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNKRLKM.

Un tel polypeptide peut être obtenu à l'aide de toute technique
5 disponible et en particulier par purification, synthèse chimique, notamment
synthèse en phase solide par la technique de Merrifield (Solid phase
peptide synthesis, J A.M. Soc. 45, p2149-2154). ou par production in vitro
dans des cellules procaryotes ou de préférence eucaryotes, sous forme
recombinante y compris le cas échéant sous la forme d'un produit de
10 fusion, par exemple avec un gène reporteur. A titre d'exemple, les
polypeptides ci-dessus décrits pourront être obtenus à partir de cellules,
notamment de cellules eucaryotes recombinées avec une séquence
d'ADNc obtenue à partir de celle décrite à la figure 5.

Selon un mode de réalisation de l'invention, le polypeptide
15 précédemment décrit est caractérisé en outre en ce qu'il a les propriétés
biologiques de la chemokine SDF-1 humaine, et en particulier en ce qu'il a
conservé l'affinité de liaison de la chemokine SDF-1 humaine vis-à-vis du
récepteur LESTR ou CXCR4.

Selon une autre mode de réalisation de l'invention, le polypeptide tel
20 que décrit ci-dessus est caractérisé en ce qu'il est dépourvu des propriétés
biologiques de la chemokine SDF-1 humaine, en particulier la
chemoattraction et la libération de calcium dans les cellules exprimant le
récepteur CXCR4.

Selon un autre mode de réalisation, l'invention a pour objet une
25 molécule dérivée de SDF-1, par substitution de sa séquence C-terminale,
par une séquence d'acides aminés hétérologue. Une séquence d'acides
aminés hétérologue peut à cet égard être dérivée d'un polypeptide de la
famille des chemokines ou d'un autre polypeptide. A titre d'exemple de
séquence hétérologue, on citera un fragment terminal de l'interleukine 8.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, l'invention a pour objet une molécule dérivée de SDF-1 par substitution, au sein de la molécule SDF-1, d'un ou plusieurs, par exemple entre 1 et 10 acides aminés, par d'autres acides aminés ou par délétion d'une séquence
5 comprise entre un à huit résidus de la partie N-terminale de la chemokine SDF-1. A titre d'exemples, les molécules dérivées sont illustrées à la figure 6A et 6B.

L'invention a également pour objet une séquence de nucléotides codant pour une chemokine SDF-1 ou pour une molécule dérivée de SDF-
10 1 telle que définie précédemment. A cet égard, l'invention concerne notamment les séquences de nucléotides choisies parmi :

- l'enchaînement de nucléotides correspondant aux nucléotides 144 à 344 de la séquence représentée à la figure 5 ou,
- l'enchaînement de nucléotides correspondant aux nucléotides 144
15 à 359 de la séquence représentée à la figure 5 ou,
- une séquence de nucléotides contenue dans cet enchaînement et codant pour une chemokine SDF-1 ou pour une molécule dérivée de SDF-1 selon les définitions données précédemment ou,
- l'un des enchaînements de nucléotides ci-dessus décrits
20 comprenant en outre en position N-terminale, un codon codant pour un résidu méthionine et le cas échéant en position C-terminale une séquence additionnelle de nucléotides.

Une séquence de nucléotides telle que décrite ci-dessus est utilisée notamment pour être exprimée dans une cellule hôte recombinée. A cet
25 égard, une séquence de nucléotides intéressante est caractérisée en ce qu'elle est placée sous le contrôle d'éléments de régulation permettant son expression dans des cellules eucaryotes, in vivo ou in vitro.

Par l'expression « éléments de régulation », on entend notamment les séquences promotrices, voire des séquences activatrices (enhancer)
30 ou toute séquence régulatrice contenue en amont de la séquence codante

de la chemokine SDF-1 humaine ou en aval du codon d'initiation de la transcription, y compris en aval de la séquence codant pour SDF-1.

A titre d'exemple, on aura avantageusement recours à des éléments de régulation propres à la chemokine SDF-1 ou au contraire à des
5 éléments de régulation hétérologues par rapport à la séquence codante de SDF-1. Dans ce cas, il peut s'agir avantageusement d'éléments de régulation contenant un promoteur inductible tel que des promoteurs synthétiques inductibles par la tétracycline.

Selon une variante de réalisation de l'invention, la séquence de
10 nucléotides est caractérisée en ce qu'elle est recombining avec la séquence d'un gène reporteur ou un fragment de ce gène, par exemple sa séquence codante.

De nombreux gènes reporteurs ont déjà été décrits dans l'art antérieur et on citera à titre d'exemple le gène reporteur comprenant la
15 séquence codante du gène lacZ, permettant l'expression de la β -galactosidase caractérisable par une réaction colorée dans les cellules qui la produisent, ou encore le gène codant pour la luciférase, ou par protéine de fusion exprimant par exemple en C-terminal, un peptide d'étiquette ou Tag, détecté par une réaction d'antigène-anticorps en utilisant un anticorps
20 anti-peptide marqué par une molécule fluorescente.

L'invention concerne également un vecteur apte à être administré dans des cellules procaryotes ou eucaryotes, in vitro ou in vivo, caractérisé en ce qu'il contient une séquence de nucléotides hétérologue répondant à l'une des définitions données précédemment, dans des conditions
25 permettant l'expression de la dite séquence hétérologue dans cette cellule.

A titre de vecteur, on citera les vecteurs choisis parmi les vecteurs plasmidiques, les vecteurs viraux ou rétroviraux et notamment les adénovirus ou les AAV. Le choix du vecteur tiendra compte des objectifs recherchés, selon par exemple qu'il s'agit de faire exprimer la chemokine
30 SDF-1 ou la molécule dérivée dans une cellule hôte in vitro, ou de définir

des moyens de prévention et/ou de traitement, par exemple par thérapie génique de l'infection par un rétrovirus VIH chez un hôte.

D'autres vecteurs utilisables dans le cadre de l'invention sont les vecteurs inertes comme par exemple les liposomes (FR 9402070).

5 Le vecteur de l'invention est avantageusement choisi en ce qu'il a la capacité de transformer des fibroblastes, des myoblastes, des cellules stromales ou des cellules hématopoïétiques, animales ou humaines. De préférence, on choisira à cette fin, un vecteur ayant un titre infectieux élevé et présentant les garanties de sécurité appropriées pour le cas
10 échéant l'administration in vivo chez un patient infecté par VIH.

L'invention a également pour objet une cellule procaryote ou eucaryote recombinée, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence de nucléotides telle que décrite précédemment, dans des conditions permettant l'expression in vitro ou in vivo de ladite séquence.

15 Des cellules eucaryotes intéressantes sont des cellules humaines ou animales et par exemple des cellules souches hématopoïétiques, des cellules stromales, des fibroblastes ou des myoblastes.

Entrent dans le cadre de l'invention des cellules recombinantes exprimant le récepteur CD4 et le co-récepteur CXCR4 et contenant une
20 séquence de nucléotides codant pour une chemokine SDF-1 ou pour une molécule dérivée selon l'invention, cette séquence étant associée à un gène reporteur et placée sous le contrôle d'un promoteur d'expression, par exemple un promoteur susceptible d'être activé par une protéine rétrovirale.

25 Les cellules recombinantes peuvent être des lignées transitoires ou permanentes, par exemple des lignées HeLa.

Elles sont utiles pour la caractérisation du phénotype des isolats rétroviraux de VIH, puisqu'elles permettent de mettre en évidence des isolats de phénotype SI capables d'activer l'expression de SDF-1.

Elles peuvent être également utilisées pour tester voire quantifier les effets de molécules choisies notamment de molécules dérivées de SDF-1 sur le récepteur CXCR4, dans des cellules infectées par le rétrovirus VIH.

- 5 L'effet inhibiteur de SDF-1 ou d'une molécule dérivée, sur l'infection par un rétrovirus VIH, peut être observé, et avantageusement quantifié en détectant ou en mesurant la transcription inverse de l'ADN proviral ou en mesurant la quantité de protéine p24 (pour VIH-1) virale produite.

- De façon générale, le suivi de l'infection pourrait comprendre la
10 détermination de la charge virale plasmatique ou cellulaire, le nombre et la fonction des lymphocytes en particulier CD4 et le statut immunologique et inflammatoire du patient.

- Entre également dans le cadre de l'invention une composition à usage thérapeutique, caractérisée en ce qu'elle comprend un principe actif
15 choisi parmi une chemokine SDF-1 ou une molécule dérivée de SDF-1, ou une isoforme du SDF1 ou encore un éventuel produit d'épissage alternatif du gène codant pour SDF1 ou tout autre ligand naturel produit d'un gène ayant la capacité de se lier au récepteur CXCR4, ou une séquence de nucléotides, un vecteur modifié par une séquence selon l'invention, ou
20 encore une cellule recombinante telle que définie précédemment.

La formulation de la composition peut varier selon que l'on recherche chez le patient un effet transitoire ou au contraire permanent du principe actif, ou selon que ce principe doit être délivré avec un effet retard.

- 25 Les taux sériques de SDF-1 à atteindre chez le patient pourraient être déterminés sur la base de concentrations de 0,1 à 100 nM dans un sérum et/ou d'autres liquides biologiques.

- Les chemokines SDF-1 ou molécules dérivées de SDF-1 ainsi que les acides nucléiques, vecteurs et/ou cellules les comprenant peuvent être
30 utilisés seuls ou en association ou en combinaison, pour l'administration

séparée ou simultanée avec d'autres molécules actives pour la prévention et/ou le traitement de l'infection par un VIH. A titre d'exemple, un agent actif dans le traitement et/ou la prévention d'une infection due à un rétrovirus VIH choisi parmi les composés ayant une activité anti-transcriptase inverse, ou anti-protéase virale ou un récepteur CD4 soluble ou une molécule ayant une activité antagoniste vis-à-vis du récepteur CD4 présent sur des lymphocytes d'un patient infecté par un rétrovirus de type VIH, ou un composé actif en immunothérapie, par exemple une interleukine et en particulier l'IL2, ou un composé actif spécifiquement contre une ou plusieurs infections opportunistes associées à la présence du rétrovirus VIH chez un patient, peut être associé aux réactifs de l'invention.

A cet égard, les chemokines SDF-1 ou molécules dérivées ainsi que les produits définis dans les pages précédentes peuvent être utilisés en association avec une ou plusieurs chemokines CXC ou CC et notamment les chemokines RANTES, MIP1- α ou MIP1- β ou encore MCP1.

D'autres agents peuvent aussi être utilisés, comme les antagonistes de la molécule RANTES et en particulier les protéines dérivées de la séquence de RANTES, par substitution, addition ou délétion d'au moins un résidu d'acides aminés, ledit antagoniste étant de préférence dépourvu des propriétés chemoattractives de chemokines vis à vis des leucocytes, en particulier des lymphocytes et étant capable de lier un ou plusieurs récepteur(s) de chemokines. Cet antagoniste sera encore désigné ci-après par RANTES.

25 L'utilisation d'une chemokine SDF-1 ou d'une molécule dérivée de
SDF-1, ainsi que des séquences de nucléotides codant pour ces
molécules ou des vecteurs ou cellules contenant ces séquences pour la
prévention et/ou le traitement d'une infection par un rétrovirus VIH, peut
être mise en oeuvre chez des patients asymptomatiques et a priori infectés
30 par des souches caractérisées comme NSI. L'utilisation ci-dessus décrite

peut alternativement être réalisée chez des patients présentant des symptômes du SIDA et infectés par des souches SI en quantité détectable.

L'invention a aussi pour objet des anticorps, notamment des anticorps idiotypiques dirigés contre le récepteur CXCR4.

5 Avantageusement, ces anticorps idiotypiques ont la capacité de se lier au récepteur CXCR4, de préférence avec une affinité voisine de celle de la molécule naturelle.

Entrent également dans le cadre de l'invention des anticorps polyclonaux ou monoclonaux dirigés contre une chemokine SDF-1 ou une
10 molécule dérivée de SDF-1 selon les définitions qui ont été données précédemment.

L'invention concerne également un procédé de détection et de quantification d'anticorps dirigés contre une chemokine SDF-1 ou une molécule dérivée.

15 D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans les figures et dans les exemples qui suivent.

Légende des figures

20 Figure 1. a : SDF-1 est le ligand de CXCR4 et est actif sur des monocytes du sang, des neutrophiles et des PBL activés par la PHA. Les modifications de la concentration en $[Ca^{2+}]$ induites par SDF-1 dans un clone CHO-1C2 exprimant CXCR4 (100, 10, 1 nM, de haut en bas) et dans les cellules parentales CHO (100 nM) sont représentées. b : Modification
25 de la concentration en Ca^{2+} , médiée par SDF-1 dans des neutrophiles, monocytes et PBL activés par PHA. SDF-1, RANTES, MIP-1 α et MCP-1 ont été utilisés à des concentrations de 100 nM. c : désensibilisation du récepteur dans des monocytes testés par les modifications de la

concentration en Ca^{2+} . d : chimiotaxie in vitro de monocytes du sang (\square), de neutrophiles (o) et de PBL activés par la PHA (Δ) en réponse à SDF-1.

METHODES

- 5 Les 67 acides aminés de SDF-1 humain (17) (numéro d'accès U16752) ont été préparés par synthèse chimique (18). Cette séquence diffère de la séquence du SDF-1 α murin (5,6), par une substitution unique (Val₁₈ au lieu de Ile₁₈) et la délétion du résidu Lys C-terminal. Les neutrophiles (19) monocytes (20) et PBL (21), ont été préparés conformément aux méthodes
- 10 décrites dans les références citées. Les PBL ont été stimulés pendant 72 heures avec 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de PHA. Des enregistrements en temps réel des modifications de la concentration Ca^{2+} dans des cellules CHO transfectées avec CXCR4 et chargées avec Fura2/AM (1) et des leucocytes du sang ont été réalisés selon la technique décrite dans (22). La désensibilisation du
- 15 récepteur a été testée dans les monocytes par monitoring de la modification de la concentration en Ca^{2+} , après stimulation répétée par des chemokines (100 nM) à des intervalles de 60 secondes, comme décrit dans (20). La chimiotaxie a été réalisée avec 10^5 cellules par puits dans des chambres contenant 48 puits en utilisant des neutrophiles ou des
- 20 monocytes ou des PBL recouverts de collagène déposés sur des membranes de polycarbonates dépourvus de polyvinylpyrrolidone avec des pores de 5 μm (20). Les cellules ayant migré sont comptées dans 5 champs sélectionnés au hasard avec une amplification de 1000 après migration pendant une heure pour les neutrophiles et les monocytes ou
- 25 pendant trois heures pour les PBL.

Figure 2. SDF-1 inhibe l'infection des cellules HeLa CD4⁺ avec les souches HIV-1 SI. a : SDF-1, au contraire de RANTES, MIP-1 α ou MIP-1 β inhibe l'infection par HIV-1_{LAV} et NL4-3. b: la formation de syncytia est

inhibée par SDF-1 mais pas par RANTES. Les cellules infectées avec HIV-1_{LAV} et cultivées pendant 24 heures ont été fixées avec 0,5% de glutaraldéhyde, et la formation de syncytia a été visualisée par coloration (détection de l'activité β -gal sur son substrat).

5

METHODES

Des cellules HeLa (LacZ) CD4+, ont été obtenues à partir de cellules HeLa(LacZ) portant le gène lacZ intégré de façon stable sous le contrôle
10 du LTR de HIV-1. Les cellules HeLa (LacZ) ont été obtenues par transfection stable avec un vecteur rétroviral contenant le cDNA de CD4 (23). $1,5 \times 10^4$ cellules HeLa(LacZ)CD4+ par puits dans des plaques de 96 puits ont été cultivées pendant 18 heures avant l'infection avec 250 μ l de surnageant de souches HIV-1_{LAV} ou NL4-3 (9) infectieuses, contenant 500
15 ng/ml ou 50 ng/ml de p24 de HIV-1 respectivement en présence de SDF-1 à 1-100nM ou 100nM RANTES, MIP-1 α ou MIP-1 β . Les surnageants infectieux de HIV-1_{LAV} et NL4-3 ont été obtenus à partir de lignées cellulaires de lymphoblastoïde MT4 et CEMX174 infectées chroniquement, respectivement. Après 24 heures, l'activité β -galactosidase a été
20 déterminée dans les lysats de cellules à partir de 3 puits. Après avoir retiré les surnageants, les cellules ont été lysées (100 μ l 60 mM $\text{Na}_2\text{-HPO}_4$, 40 mM NaH_2PO_4 , 10 mM KCL, 10 mM MgSO_4 , 2.5 mM EDTA, 50 mM β -mercaptoéthanol et 0.125% NP40 et mélangées avec 100 μ l 80 mM sodium phosphatase, pH 7.4, 10 mM MgCl_2 , 50 mM β -mercaptoethanol et
25 6 mM de sel monosodium de chlorophénol rouge β -galactopyranoside et incubées pendant 20 minutes à 37°C avant de mesurer l'absorbance à 540 nm. L'activité moyenne en pourcentage des trois valeurs est indiquée. Les données sont représentatives de quatre expériences similaires.

Alternativement, on pourra remplacer le gène rapporteur LacZ par celui de la luciférase, comme moyen de visualisation de la formation de syncytia.

Figure 3A: SDF-1 bloque l'entrée de HIV-1_{LAI} dans des cellules HeLa(LacZ) CD4+. a: amplification par PCR d'ADN proviral retrotranscrit en présence ou en absence de 100 nM SDF-1 ou RANTES. b: Absence d'inhibition des événements postérieurs à l'entrée du virus dans les cellules par SDF-1 après l'infection par HIV-1NL4-3(Δ Env)G.

Figure 3B: Electrophorèse des produits d'amplification des produits des cellules HeLa(LacZ) CD4+ traitées avec des chemokines RANTES ou SDF-1, ou non traitées.

METHODES:

a: Quantification de l'ADN proviral nouvellement synthétisé dans des cellules HeLa(LacZ)CD4+ avec SDF-1. 2×10^6 cellules dont 4 ml ont été infectés pendant 2 heures avec 2 ml de surnageant infectieux généré par des cellules MT4 infectées chroniquement (100 ng/ml HIV-1 p24) en présence ou en l'absence de 100 nM SDF-1 ou RANTES. Les cultures ont été lavées trois fois, complétées avec les chemokines correspondantes et cultivées pendant 6 heures supplémentaires. Après extraction de l'ADN total (24), la PCR a été réalisée avec des amorces pour l'ADN proviral (amorce 3' CCTGCGTCGAGAGAGCTCCTCTGG-3' et amorce 5' GGCTAACTAGGGAACCCACTG-3' marquées à leur extrémité avec 32 P dans 50 μ l de 0.25 mM dNTPs, 50 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 8,0, 5 mM MgCl₂, 100 mg/ml de BSA et 1,5 unité de Taq d'ADN polymérase (Amersham) pour 25 cycles. Les amorces correspondent aux positions de nucléotides 496-516 (premier nucléotide à la position 42 en amont du site d'initiation de transcription) et 695-672 (séquence complémentaire dans GAG) dans la souche HIV-JR_{CSF}. Les amorces pour l'ADN de la β -actine sont les suivantes : amorce 5'

GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3' et amorce 3'
CGGTTGGCCTTGGGGTTCAGGGGGG-3'. Les amorces pour l'ADN de la
β-actine conduisent à un produit d'amplification de 244 pb et ont été
utilisées pour la standardisation du test. L'AZT (50 μM) a été utilisé pour
5 vérifier la spécificité du signal. Les produits d'amplification ont été
analysés par électrophorèse sur gel d'agarose et autoradiographie. Les
expériences de PCR ont été réalisées dans les mêmes conditions. b: Les
cellules HeLa(lacZ)CD4+ (2x10⁴ par puits) ont été déposées sur des
microplaques de 96 puits et infectées à trois reprises en présence et en
10 l'absence de SDF-1 pendant 24 heures avec 250 μl de surnageant
infectieux contenant soit la souche sauvage de type LN4-3 (10 ngHIV-1
p24 par puits) ou la souche LN4-3 pseudotypée (NL4-3 (ΔEnv)G (0,25 ng
HIV-1 p24 par puits) dont le gène env était délété et qui portait la
glycoprotéine G du virus de la stomatite vésiculaire. Les particules LN4-3
15 ont été générées par transfection transitoire de cellules COS7 avec l'ADN
cloné de pNL4-3. Les particules NL4-3 (ΔEnv)G ont été obtenues par co-
transfection avec un plasmide contenant l'ADN de NL4-3 délété du
fragment BglII-BglII au niveau du gène d'enveloppe et avec le plasmide
pCMV portant l'ADN pour la glycoprotéine G du VSV. Après lyse des
20 cellules, l'activité β-galactosidase a été déterminée (figure 2). Les données
sont représentatives de quatre expériences différentes.

Figure 4 : SDF-1 bloque l'infection par des souches de HIV-1 ayant un
tropisme pour les lymphocytes mais pas pour les souches ayant un
25 tropisme pour les monocytes et les macrophages lorsque le test est réalisé
sur des PBMC activés par la PHA. a: inhibition de l'infection par HIV-1_{LAV} à
l'aide de SDF-1 ajouté à 100 nM pendant et après (Δ), seulement après (□)
l'infection ou en l'absence d'infection (O). Les cultures avec des PBMC de
donneurs différents (symboles blancs ou noirs) ont été poursuivies

pendant 12 jours. b: aucune inhibition de l'infection avec HIV-1 JR_{CSF} ou HIV-1 YU2 n'a été observée dans des PBMC traités avec la PHA par SDF-1. SDF-1 (O) ou RANTES (Δ), tous les deux à 100 nM ont été ajoutés ou omis (□) après l'infection des PBMC de différents donneurs (symboles blancs ou noirs) et le taux de p24 libérée a été évalué pendant les 13 jours de culture.

METHODES. Les PBMC de donneurs de sang sains ont été stimulés pendant 48 heures avec 1 µg/ml de PHA (Wellcome, Grande-Bretagne) dans du RPMI 1640, avec 10% de sérum bovin foetal (FCS). Ces PBMC ont ensuite été infectés pendant 2 heures avec l'équivalent de 10 à 20ng de p24 de HIV-1 (10⁷ cellules par infection dans 4 ml) en présence ou en l'absence de chemokines. Les particules HIV-1 JR_{CSF} (25) et YU2 (26) ont été générées par transfection de cellules COS7 avec des plasmides portant l'ADN proviral total. Des PBMC infectés ont été lavés 4 fois avec un tampon phosphate salin et cultivés dans RPMI 1640, avec 10% de FCS plus 20 ng/ml d'IL-2 avec ou sans chemokines. Les cultures ont été retraitées tous les trois jours avec l'IL-2 et les chemokines, la présence de p24 soluble de HIV-1 a été déterminée par ELISA (DuPont de Nemours, France).

Figure 5: Séquence d'ADNc contenant la séquence codant pour la chemokine SDF-1 humaine, et séquence d'acides aminés exprimée.

Figure 6 : Alignement des séquences des molécules dérivées de SDF-1. Les séquences de SDF-1 β, SDF-1 (forme comprenant 67 résidus), et les molécules dérivées. Les chimères SDF-1/chemokines ont le nom de la chemokine correspondante suivi de H1 ou H2. Pour les chimères, les parties de la séquence correspondant à SDF-1 sont soulignées. Les chemokines d'origine sont données pour comparaison. GRO est aussi

appelé GROalpha ou MGSA (Baggiolini et al. Ann. Rev. Immunol. 15, 675-705).

EXEMPLE 1 : INFECTION DE DIFFERENTES CELLULES AVEC
5 DIFFERENTS ISOLATS

SDF-1 active les cellules d'ovaires de hamster chinois (CHO) transfectées avec le cDNA du récepteur CXCR4 et active également les leucocytes et les lymphocytes du sang. Dans des lignées cellulaires exprimant les récepteurs CXCR4 et CD4, également dans des lymphocytes
10 du sang, SDF-1 est un inhibiteur potentiel puissant de l'infection par des souches de HIV lymphotropes (souche SI) alors que les chemokines de type RANTES, MIP-1 α et MIP1- β qui ont été caractérisées comme ayant des propriétés inhibitrices sur des souches de HIV de type primaire ayant un tropisme pour les monocytes (Cocchi, F. et al, Science, 270, 1811-
15 1815, 1995) sont inactives.

SDF-1, le cas échéant en combinaison avec des chemokines de la famille CC qui bloquent l'infection par des virus ayant un tropisme pour les monocytes ou les macrophages, pourrait avantageusement diminuer la charge virale et prévenir l'émergence de virus de phénotype SI (syncytium
20 inducing viruses), caractéristique des stades tardifs de la maladie du SIDA (Weiss, R.A., Science, 272, 1885-1886, 1996).

Lorsque le SDF-1 humain a été testé avec un clone CHO-1C2 (Loetscher M. et al, J. Biol. Chem. 269, 232-237, 1994) qui exprime de façon stable LESTR, une augmentation transitoire de la quantité de
25 calcium libre cytosolique ($[Ca^{2+}]_i$) a été observée (figure 1a). Cette réponse caractéristique de l'action des chemokines sur des leucocytes du sang n'était pas observée avec les cellules parentales CHO. D'autres chemokines, incluant RANTES, MIP-1 α et MIP-1 β n'étaient pas actives. Les monocytes, neutrophiles et les lymphocytes du sang périphériques,
30 activés avec la phytohémagglutinine (PHA), étaient également stimulés par

la molécule SDF-1, comme le montrent les variations de la concentration de calcium $[Ca^{2+}]_i$ et la chimiotaxie (figures 1b, d). Des enregistrements en temps réel de la mobilisation du calcium Ca^{2+} après stimulation séquentielle, fournissent une méthode fiable pour estimer le comportement des chemokines vis-à-vis de récepteurs. La stimulation avec une chemokine (à des concentrations de saturation) conduit à une désensibilisation du récepteur et aucune réponse n'est observée lorsque les cellules sont restimulées après une brève période avec une chemokine agissant sur le même récepteur. Comme le montre la figure 1c, des monocytes stimulés avec SDF-1 restaient sensibles à une stimulation ultérieure avec MCP-1, RANTES ou MIP-1 α et lorsque la stimulation était au contraire effectuée en premier lieu avec MCP-1, RANTES ou MIP-1 α , aucune de ces chemokines n'affectait les modifications de la concentration en Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) induites par SDF-1 utilisé comme second stimulus. Ceci montre que SDF-1 ne partage pas de récepteur avec les chemokines de la famille CC. Les réponses fonctionnelles et les résultats de désensibilisation montrent en outre que le LESTR est sélectif vis-à-vis de SDF-1, seul ligand naturel identifié jusqu'à ce jour. Le lien entre le récepteur et son ligand étant maintenant identifié, les inventeurs ont proposé d'appeler les molécules LESTR/fusin différemment à savoir CXCR4, de façon à conserver la nomenclature de récepteurs établie lors de la conférence de Gordon en 1996 sur les chemokines.

Les effets de SDF-1 sur l'infection par HIV-1 ont été testés tout d'abord avec des cellules HeLa transfectées avec CD4 et portant un gène reporteur dont l'expression était dirigée par le LTR de HIV-1 (Clavel F. J. Virol., 68, 1179-1185, 1994). Ce gène reporteur, à savoir la séquence LacZ de *E. coli*, intégré aux cellules, a été induit par la protéine Tat de transactivation codée par HIV-1. L'induction de la galactosidase, produit d'expression du gène lacZ reflétait la transactivation par la protéine Tat et par conséquent, l'infection par HIV-1. Comme les leucocytes et différentes

cellules de tissus, la lignée cellulaire de carcinome épithélial HeLa exprime de façon constitutive le récepteur CXCR4 (Feng, Y. et al, Science, 272, 872-877, 1996 et Nomura, H. et al, Int. Immunol. 5, 1239-1249, 1993). Les cellules HeLa ont été infectées avec deux virus, les isolats HIV-1_{LAI} (isolat
5 LAV), ou le clone NL4-3 de HIV-1 qui comporte la glycoprotéine d'enveloppe (Env) de LAV (Adachi, A. et al, J. Virol. 59, 284-291, 1986). SDF-1 s'est comporté comme un inhibiteur potentiel puissant de l'infection par les deux virus comme l'a montré l'expression de la β -galactosidase réduite de 50, 70, voire 95% à des concentrations 1, 3 et 30 nM de SDF-1
10 (figure 2a). Au contraire, aucune inhibition n'était observée lorsque SDF-1 était remplacé par 100 nM de RANTES, MIP-1 α ou MIP-1 β . Ces chemokines reconnaissent les récepteurs CCR1, CCR5 et en partie CCR3 (Deng et al, Nature, 381, 661-666, 1996 ; Dragic et al, Nature, 381, 667-673, 1996 ; Alkhatib et al, Science, 272, 1955-1958, 1996 ; Choe, H., et al,
15 Cell, 85, 1135-1148, 1996 ; Doranz et al, Cell, 85, 1149-1158, 1996) mais comme le montre la figure 1, ne reconnaissent pas CXCR4. L'inhibition très importante par SDF-1, de l'infection et de la formation de syncytia, ainsi que l'absence d'activité de RANTES sont illustrées par la figure 2b.

Aucune expression de β -galactosidase n'a été observée dans les
20 cellules infectées qui ont été mises en culture en présence de l'inhibiteur de la transcriptase inverse, l'azidothymidine (AZT), indiquant que le gène reporteur était seulement induit par l'infection.

Pour vérifier que l'action de SDF-1 est associée à la présence de CXCR4, des cellules CHO-1C2 exprimant le récepteur ont été transfectées
25 avec CD4 et infectées avec la souche NL4-3 portant le gène reporteur codant pour la luciférase. Comme dans le cas des cellules HeLa, SDF-1 a inhibé l'expression du gène reporteur indiquant une inhibition de l'infection par NL4-3.

L'effet inhibiteur de SDF-1 a également été étudié en suivant la
30 transcription inverse (reverse transcription) de l'ADN proviral de HIV-1

consécutive à l'entrée du virus dans des cellules, en utilisant la technique de PCR. Des extraits de cellules HeLa exprimant le récepteur CD4 (cellules HeLa CD4+) ont été obtenus six heures après l'addition de HIV-1_{LAV} ; ces extraits contenaient l'ADN proviral spécifique. En présence de SDF-1, l'apparition d'ADN proviral était considérablement réduite alors qu'aucun effet sur la production d'ADN proviral, n'a été observé en présence de RANTES. Aucun transcrit n'a été obtenu lorsque l'inhibiteur de la transcriptase inverse, l'AZT, était ajouté aux cultures (figure 3a).

Il était important d'évaluer si SDF-1 inhibait l'infection par compétition avec le virus pour la liaison au récepteur CXCR4 ou en interférant avec un événement postérieur à l'entrée du virus dans les cellules. Pour ce faire, des souches pseudotypées, HIV-1 NL4-3 exprimant la glycoprotéine G du virus de un stomatite vésiculaire (VSV) à la place de la protéine Env du virus Lav (Yee et al, PNAS, USA, 91, 9564-9568, 1994) ont été utilisées. NL4-3 (Δ Env)G infectait les cellules par interaction de la glycoprotéine G avec les phospholipides de la membrane, et ne dépendait pas des récepteurs spécifiques de HIV. Comme l'a montré l'expression de β -galactosidase, SDF-1 n'avait pas d'effet sur la réplication de NL4-3(Δ Env)G contrastant avec l'effet d'inhibition dépendant de la concentration obtenue avec NL4-3 (Figure 3b).

Ces résultats excluent un effet de SDF-1 sur l'expression de l'ADN proviral de HIV-1 et suggèrent que SDF-1 inhibe l'infection par HIV à des stades précédant la transcription inverse et probablement interfère avec une interaction du virus avec les récepteurs CD4 et CXCR4.

Après activation, les cellules mononucléées du sang périphérique humain (PBMC) permettent la réplication de HIV-1 in vitro. Pour tester l'activité inhibitrice de SDF-1, les PBMC ont été activés avec la PHA avant l'infection avec HIV-1_{LAV} et on a mesuré l'accumulation de p24 de HIV-1 soluble. Lorsque SDF-1 était présent à partir du moment de l'infection jusqu'à la fin de l'expérience (jour 12), la protection était apparemment

complète (>98%), et un degré élevé de protection a été observé même lorsque SDF-1 était ajouté après la période d'infection comme le montre la figure 4a. L'infection avec des souches HIV-1 ayant un tropisme pour les monocytes ou les macrophages tels que HIV-1, JR_{C3F} ou YU2), au contraire était inhibée par RANTES mais n'était pas affectée par SDF-1 (Figure 4b).

La discrimination claire des mécanismes d'entrée des virus ayant différents tropismes est mise en évidence par l'inhibition par SDF-1 de l'infection due à des souches ayant un tropisme pour les lymphocytes et de l'infection par des souches ayant un tropisme pour les monocytes ou les macrophages par RANTES, MIP-1 α et MIP-1 β . Ceci pourrait être important pour l'évaluation de la progression de l'infection VIH vers le stade SIDA. Grâce à sa variabilité importante, le génome de HIV-1 est susceptible d'adapter sa protéine Env à différents récepteurs de Chemokine. Après des années d'infection asymptomatique, avec des virus formant des quasi-espèces monocytootropes, lorsque la maladie devient cliniquement apparente, des virus inducteurs de syncytium apparaissent, qui ne reconnaissent pas les récepteurs CCR5 ou CCR3 et se répliquent rapidement dans les leukocytes exprimant CD4 avec CXCR4 comme co-récepteur. L'adaptation de HIV à l'entrée médiée par le récepteur CXCR4 dans les cellules représente un avantage biologique majeur pour le virus qui ainsi aurait à sa disposition un répertoire beaucoup plus étendu de cellules infectables. En fait, CXCR4 est exprimé constitutivement à de hauts niveaux dans les PBMC (Loetscher, M. et al, J. Biol. Chem. 269, 232-237, 1994) et également dans certaines cellules de tissus (Loetscher, M. et al, J. Biol. Chem. 269, 232-237, 1994 ; Nomura, H. et al, Int. Immunol. 5, 1239-1249, 1993 ; Jazin et al, Regul. Pepr. 47, 247-258, 1993), là où l'expression de récepteurs de chemokines CC est faible. Il apparaît donc que le blocage de l'infection par des virus SI adaptés à CXCR4 est obtenu. L'administration ou l'induction de SDF-1 pourrait

inhiber la dissémination de ces virus et éventuellement prévenir leur émergence chez des patients souffrant d'une infection chronique par HIV.

EXEMPLE 2 : INFECTION DE CELLULES HeLa CD4+ (LTR β GA) PAR
5 HIV-1 LAI ET TRAITEMENT AVEC SDF-1, CD4 SOLUBLE, OU UN
MELANGE SDF-1/CD4 SOLUBLE

1) Des cellules HeLa CD4+ ont été soumises à un passage dans une plaque de 96 puits (25000 cellules/puits) dans un milieu DMEM (200 μ l) avec 10 % de SFV.

10 2) Le lendemain les cellules HeLa CD4+ ont été infectées avec un surnageant infectieux. Les manipulations ont été réalisées avec différents isolats viraux:

- le VIH-1_{LAI} provenant de cellules CEM infectées (titre 104 ng/ml de p24);

15 - le surnageant de transfection infectées avec l'isolat JR-CSF provenant de cellules COS 7 transfectées par l'ADN proviral de cet isolat (titre 15 ng/ml de p24) ;

- l'isolat primaire PYU2 provenant de cellules COS 7 transfectées par l'ADN proviral de cet isolat (titre 7 ng/ml de p24).

20 Pour l'infection des cellules HeLa CD4+, les essais ont été faits en triplicate soit 50 μ l/puits de surnageant infectieux.

La gamme des concentrations en réactifs était la suivante :

pour CD4 soluble (SCD4) : 10 μ g/ml, 3 μ g/ml, 1 μ g/ml, 0,3 μ g/ml, 0,1 μ g/ml, 0,03 μ g/ml, 0,01 μ g/ml, 0,003 μ g/ml ;

25 Le CD4 soluble a été décrit dans le brevet FR 2570278 et dans la demande internationale WO 88/01304.

pour SDF1 : 30 nM, 10 nM, 3 nM, 1 nM.

Les cellules HeLa CD4+ contiennent sous forme intégrée, le gène reporteur de la β -galactosidase placé sous le contrôle d'un LTR rétroviral

(cellules HeLa (LacZ) CD4+). Rappelons que les cellules HeLa expriment de façon constitutive le récepteur CXCR4.

Les cellules ont été réparties en trois groupes chacun de ces groupes étant infecté avec 50 µl de surnageant infectieux (isolats HIV-1 LAI
5 ou JR-CSF ou PYU2).

Dans chaque groupe le surnageant infectieux contenait en outre

- soit SDF1 à différentes concentrations (concentration finale dans le puits : 10 nM, 3nM, 1 nM),

- soit SDF1 (aux différentes concentrations ci-dessus) en mélange
10 avec CD4 soluble à différentes concentrations (10µg/ml, 3 µg/ml, 1ng/ml 0,3 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,03 µg/ml, 0,01 µg/ml, 0,003 µg/ml),

- soit CD4 soluble à différentes concentrations indiquées ci-dessus.

Les cellules HeLa (LacZ) CD4+ non infectées (C.NI) ou infectées (C.I.) avec le surnageant viral mais non traitées avec SDF1 ou CD4
15 soluble ont été utilisées comme témoins.

Les résultats obtenus ont été observés en mesurant la densité optique correspondant à l'expression de β-galactosidase (D 0 à 570 nm).

La β-galactosidase est exprimée lorsque le LTR qui contrôle la séquence LacZ est activé par la protéine TAT exprimée lorsque le
20 rétrovirus VIH est produit.

**Cellules HeLa(LacZ) CD4+ infectées avec
isolat viral**

	PYU2	JR-CSF	LAI	C.NI
Mesure de la DO à 570 nm	1 0,147	0,150	1,785	0,153
	2 0,151	0,145	1,997	0,154
	3 0,149	0,143	1,561	0,160

Pour les cellules infectées avec l'isolat HIV-1 LAI, traitées avec SDF-1 seul (SDF-1), CD4 soluble seul (CD4 sol) ou une association de SDF1 et CD4 soluble (SDF1 et CD4 sol), la densité optique pour l'expression de β -galactosidase a été mesurée (les concentrations correspondent à la concentration finale dans le puits)

C.I. (LAI) traitées avec	DO mesurée (570nm)		
SDF1 10 nM	0,360	0,390	0,350
SDF1 3 nM	0,448	0,387	0,354
SDF1 1 nM	0,832	0,855	0,869
CD4 sol. 100 ng/ml	0,701	0,647	0,690
SDF1 : 10 nM et CD4 sol. à 100 ng/ml	0,218	0,224	0,246
SDF1 : 3 nM et CD4 sol. à 100 ng/mg	0,265	0,252	0,267
SDF1 à 1 nM et CD4 sol. à 100 ng/ml	0,406	0,447	0,392

Commentaires :

10

1) En présence de SDF1 à 10 nM avec CD4 soluble à 100 ng/ml, on a observé une diminution de la production virale car la DO était inférieure à celle observée avec CD4 seul ou SDF1 seul, correspondant à une

diminution de la production de l'activité β -gal, c'est-à-dire de particules virales dans les cellules.

- 2) Avec SDF-1 3nM associé à CD4 soluble à 100 ng/ml, la DO mesurée était inférieure à celle trouvée avec SDF seul ou CD4 soluble seul.

EXEMPLE 3 : EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIVIRALE SUR HIV LAI DE MOLECULES DERIVEES DE SDF-1

10 Synthèse chimique

SDF-1, SDF-1 β et toutes les molécules dérivées de SDF-1 ont été synthétisées par les méthodes de synthèse en phase solide en utilisant le groupe tBoc comme protection chimique. Après déprotection avec le fluorure d'hydrogène, les polypeptides ont été repliés, et purifiés selon la technique décrite par Clark-Lewis et al (1994. J. Biol. Chem. 269, 16075-16081). Des résidus [15 N]-Val et [15 N]-Leu ont été incorporés pour former un dérivé tBoc marqué par un isotope (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA). La pureté des produits a été testée par chromatographie HPLC par échange d'ions et spectrométrie de masse. La masse mesurée de chaque produit final, déterminée par spectrométrie de masse avec électrospray, était en accord avec la masse moyenne calculée à partir de la composition atomique.

25 Ultracentrifugation avec sédimentation à l'équilibre

Ces études ont été réalisées sur un appareil Beckman Spinco Model E permettant l'ultracentrifugation analytique, utilisant l'absorbance optique. Les étapes de sédimentation ont été réalisées à une concentration d'environ 0,5 mg/ml dans du phosphate de sodium 50 mM, 100 mM de

chlorure de sodium et à pH 5 et 7. Les masses moléculaires obtenues à partir des données de sédimentation ont été déterminées selon la technique de Rajarathnam et al (1994b. Science. 264, 90-92). Les masses moléculaires calculées pour SDF-1 (7800 à pH 5,0 et 7840 à pH 7,0) et pour SDF-1 β (8540 à pH 5,0 et 8980 à pH 7,0) étaient en accord avec les masses moléculaires des monomères (SDF-1 = 7835 ; SDF-1 β = 8526). ➤

Mesures du calcium libre présent dans les cellules

Des lymphocytes du sang périphérique activés avec de la phytohémagglutinine ou des cellules CEM (lignée de cellules T humaines) ont été utilisées pour réaliser les tests avec SDF-1. Les cellules ont été chargées avec du Fura-2 acetoxyméthyl ester (0,4 nmol pour 10^6 cellules), puis lavées et stimulées avec la chemokine ; la modification de la fluorescence en fonction du temps a été enregistrée et le taux de modification en $[Ca^{2+}]_i$ a été déterminé (von Tscharner et al 1986. Nature 324. 369-372).

Test de chimiotaxie

La migration des cellules a été évaluée en utilisant les microchambres de Boyden (NeuroProbe, Cabin John, MD). Des échantillons ont été dilués dans du milieu RPMI contenant de la Serum Albumine Bovine (10 mg/ml) et Hepes (25mM). Des échantillons de 25 μ l ont été ajoutés aux puits inférieurs des micro chambres Boyden. Les puits ont été couverts avec un filtre Nucleopore au polycarbonate (taille des pores 3 μ m) puis 50 μ l de suspension de cellules CEM (5x10⁶/ml) ont été ajoutés aux puits supérieurs, en suspension dans le tampon ci-dessus. Après deux heures à 37°C en atmosphère humide, les cellules qui avaient migré dans les puits inférieurs ont été comptées. Toutes les déterminations ont été réalisées

trois fois. Le bruit de fond correspond à la valeur moyenne des cellules migrant dans le seul milieu

Marquage de SDF-1 avec I^{125} et liaison au récepteur

5

Une recherche extensive a été menée pour identifier les lignées cellulaires qui donnaient une liaison saturable au récepteur et reproductible. Bien que le récepteur CXCR4 soit largement exprimé, la plupart des cellules y compris les cellules T activées, du sang périphérique, les cellules T Jurkat, 10 les cellules HEK 293 transfectées avec CXCR4 avaient des niveaux élevés de liaison non spécifique au récepteur. SDF-1 est extrêmement basique (pI 11,5), et le facteur 4 plaquettaire, qui est une autre protéine basique apparentée aux chemokines, conduisait également à une liaison non spécifique, suggérant que cette caractéristique pouvait être à la base de 15 l'observation.

La lignée CEM de cellules T a montré une liaison saturable et fiable de SDF-1 et a été utilisée pour toutes les études de liaison. Cette lignée a aussi été utilisée pour des tests d'infection par HIV-1 médiée par CXCR4 20 (Gervais et al. 1997. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94, 4653-4658). La liaison des molécules dérivées de SDF-1 a été déterminée par compétition avec la liaison de SDF-1 marqué avec I^{125} . SDF-1 a été marqué en utilisant la lactoperoxydase. 1 mCi (3,7 Mbq) de $Na^{125}I$ (ICN, Biomedicals, Irvine, CA) et 1 μ g de lactoperoxydase (80-15 U.mg⁻¹; Sigma Chemical Co., St Louis, 25 MO) ont été ajoutés à 5 μ g de SDF-1, dans 50 μ l d'acétate de sodium 0,5M, pH 6,5, à température ambiante pour 3 min. Pour arrêter la réaction, de la tyrosine saturée (150 μ l) a été ajoutée et SDF-1 marqué a été séparé du marqueur libre par chromatographie sur Sephadex G-25. Pour les tests de liaison les cellules (2×10^6) ont été maintenues à 4°C pendant 30 min 30 en présence de 4nm de SDF-1 marquée avec I^{125} , et des concentrations

croissantes de compétiteur non marqué (10^{-10} à 10^{-5} M), dans 200 μ l du milieu RPMI, contenant Hepes (25 mM), BSA (10 mg.ml^{-1}) et de l'azide de sodium (0,1%). Le nombre de cpm associé aux cellules a été déterminé en séparant immédiatement les cellules par un mélange de diacetylphthalate et de dibutylphthalate dans des proportions de 2:3. Le nombre de cpm correspondant à une liaison spécifique a été calculé en soustrayant le nombre de cpm correspondant à une liaison non spécifique (le nombre de liaisons cpm en présence d'un excès molaire de 100 fois de SDF-1 non marqué) du nombre total de cpm liés aux cellules. Les constantes de dissociation (valeurs de K_d) ont été déterminées par l'analyse de Scatchard.

Réplication de HIV-1

Des tests ont été réalisés en utilisant une lignée cellulaire clonale de cellules HELA CD4⁺ comportant un gène *lacZ* sous le contrôle du LTR de HIV (Clavel et Charneau, 1994, J. Virol. 68, 1179-1185.). Ces cellules HELA CD4⁺ LTR-*lacZ*, $1,5 \times 10^4$ par puits dans un support de 96 puits, ont été cultivées avec 250 μ l de surnageants infectieux de HIV LAI en présence de différentes concentrations de molécule dérivées de SDF-1, trois fois. Après 24h, la β galactosidase a été mesurée dans les lysats cellulaires. Les cellules ont été lysées dans 100 μ l d'un tampon contenant 0,125% NP40, 60 mM $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$, 40mM $\text{NaH}_2 \text{PO}_4$, 50 mM 2-mercaptoethanol, 2,5 mM EDTA et 100 μ l de 80 mM de phosphate de sodium à pH 7,4, 10 mM MgCl_2 , 50 mM β -mercaptoethanol, puis 6 mM de sel de monosodium de chlorophenol rouge- β galactopyranoside ont été ajoutés. Le mélange a été incubé pendant 20 minutes à 37°C et l'absorbance a été mesurée à 570 nm.

Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau qui suit :

Résumé des études activité - structure SDF-1

Analog ^a	[Ca ⁺⁺] EC30 (nM) ^b	Binding Kd (nM) ^c	HIV IC50 (nM) ^d
SDF-1	1.1	3.6 ± 1.6	79
SDF-1β	1.0	2.2 ± 1	40
SDF1 2-67	>10,000 (A)	20 ± 9	UD
SDF1 3-67	UD (A)	46 ± 11	UD
SDF1 4-67	UD	340 ± 112	UD
SDF1 5-67	UD	390 ± 210	UD
SDF1 6-67	UD	410 ± 134	UD
SDF1 7-67	UD	470 ± 6	UD
SDF1 8-67	UD	490 ± 269	UD
SDF1 9-67	UD	UD	UD
Gly-SDF1	0.3	3 ± 0.8	79
K1R	>10,000 (A)	13 ± 7	794
K1Orn	5.4	5.8 ± 3.5	631
P2G	UD (A)	9 ± 1	562
V3I	0.3	2.7 ± 1.5	63
S4A, L5Q, S6A	25	9 ± 5	355
Y7A	7.8	15 ± 0	708
Y7H	3.5	3.2 ± 0.7	112
R8K	4.5	18 ± 7	794
IP10H1	154	917 ± 118	ND
IP10H2	6.5	57 ± 25	UD
IP10	UD	UD	UD
GROH1	7.5	51 ± 11	ND
GROH2	1.1	10 ± 11	446
GRO	UD	UD	UD
IL8H1	>10,000	UD	UD
IL8H2	10,000	UD	UD
IL8	UD	UD	UD
ALLYY	6	29 ± 6	467
EEE	>10,000	UD	UD
EEE2	115	976 ± 281	UD
K1Ac	1000	458 ± 175	UD

Légende du tableau :

a : les séquences des molécules dérivées de SDF-1 (appelées « analogues ») sont présentées à la figure 6.

5 b : la concentration efficace pour parvenir à un taux de 30% maximum (EC30) d'induction de calcium libre intracellulaire a été déterminée à partir des courbes dose - réponse.

c : les constantes de dissociation ($K_d \pm SD$) sont égales à la moyenne obtenue à partir de trois expériences différentes de liaison par compétition.

10 d : les analogues ont été titrés dans le cadre du test du caractère infectieux de HIV et l'inhibition de HIV a été déterminée par titration de chaque analogue.

UD = indétectable ; ND = non donné ; A = antagoniste.

15 EXEMPLE 4 : EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIVIRALE SUR HIV LAI DE MOLECULES DERIVEES DE SDF-1

Dans les mêmes conditions que celles décrites dans l'exemple 3 mais dans des gammes de concentrations variant de 0 nM à 1000 nM, différentes molécules dérivées de SDF-1 ont été testées sur l'infection par

20 HIV LAI. Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau qui suit :

7,81 nM	3,9nM	1,95nM	0,97nM	0nM
86,86 \pm 6,87	95,41 \pm 3,21	103,81 \pm 11,8	110,75 \pm 17,34	100
72,72 \pm 7,41	85,57 \pm 7,65	83,42 \pm 16,75	93,54 \pm 5,27	100
138,6 \pm 36,54	170,23 \pm 25,53	163,5 \pm 46,34	174,13 \pm 13,94	100
88,17 \pm 23,83	86,75 \pm 21	89,64 \pm 2,47	90,48 \pm 8,77	100
127,04 \pm 36,73	124,37 \pm 33,6	11,08 \pm 21,51	122,65 \pm 23,41	100
75,61 \pm 21,23	77,51 \pm 21,23	73,3 \pm 15,3	91,3 \pm 14,61	100
81,26 \pm 38,73	94,81 \pm 57,43	103,73 \pm 38,9	121,64 \pm 18,11	100
84,64 \pm 17,89	87,57 \pm 10,47	97,47 \pm 10,76	89,3 \pm 20	100
116,05 \pm 24,66	99,66 \pm 22,25	95,48 \pm 30,13	96,94 \pm 25,64	100
100,97 \pm 12,3	117,46 \pm 30,62	125,95 \pm 14,43	118,37 \pm 20,06	100
118,72 \pm 21,45	133,06 \pm 33,01	118,12 \pm 15,01	131,04 \pm 18,04	100
97,2 \pm 18,1	99 \pm 21,3	119 \pm 19,8	89,64 \pm 19	100
132,95 \pm 18,8	123,98 \pm 26,43	130,41 \pm 13,47	138,43 \pm 16,55	100

Références:

1. Loetscher, M. et al, J. Biol. Chem. 269, 232-237 (1994)
- 5 2. Feng, Y. et al, B. J. Biol. Chem. 269, 232-237 (1994)
3. Cocchi, F. et al, Science, 270, 1811-1815 (1995)
4. Weiss, R.A., Science, 272, 1885-1886 (1996)
5. Tashiro, K. et al, Science, 261, 600-603, 1993
6. Nagasawa, T. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 2305-2309,
10 1994.
7. Baggiolini, M. et al, Adv. Immunol. 55, 97-179, 1994
8. Nomura, H. et al, Int. Immunol. 5, 1239-1249, 1993
9. Adachi, A. et al, J. Virol. 59, 284-291, 1986
10. Deng et al, Nature, 381, 661-666, 1996
- 15 11. Dragic et al. Nature, 381, 667-673, 1996
12. Alkhatib, et al, Science, 272, 1955-1958, 1996
13. Choe, H., et al, Cell, 85, 1135-1148, 1996
14. Doranz et al, Cell, 85, 1149-1158, 1996
15. Yee et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 9564-9568, 1994
- 20 16. Jazin et al, Regul. Pepr. 47, 247-258, 1993
17. Bleul, C.C., et al, J. Exp. Med., 1996, in press
18. Clark-Lewis, I. et al, Biochemistry 30, 3128-3135, 1991
19. Peveri P. et al, J. Exp. Med. 167, 1547-1559, 1988
20. Uguccioni, M. et al, Eur. J. Immunol. 25, 64-68, 1995
- 25 21. Colotta, F. et al, J. Immunol. 132, 936-944, 1984
22. von Tscharner, V. et al, Nature, 324, 369-372, 1986
23. Clavel, F. et al, J. Virol. 68, 1179-1185, 1994
24. Jacque, J.M., et al, J. Virol. 70, 2930-2938, 1996
25. Cann, A.J., et al, J. Virol., 4735-4742, 1990
- 30 26. Li, Y. et al, J. Virol., 66, 6587, 1992

REVENDECATIONS

1. Chemokine SDF-1 ou molécule dérivée de SDF-1 pour la
prévention et/ou le traitement d'une infection par un rétrovirus VIH,
5 caractérisée en ce qu'elle répond à la séquence d'acides aminés ci-
dessous ou en ce qu'elle est contenue dans cette séquence, ou en ce
qu'elle contient cette séquence :

KPVSLSYRCP CRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCI
DPKLKWIQEYLEKALN.

10 2. Chemokine SDF-1 ou molécule dérivée de SDF-1 selon la revendication 1, pour la prévention et/ou le traitement d'une infection par un rétrovirus VIH, caractérisée en ce qu'elle contient l'enchaînement d'acides aminés suivant :

15 KPVSLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCI
DPKCLKWIEYLEKALN.

3. Chemokine SDF-1 ou molécule dérivée selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, pour la prévention et/ou le traitement d'une infection par un rétrovirus VIH, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une protéine répondant à l'un des enchaînements d'acides aminés suivants :

20 MKPVLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQV
CIDPKLKWIQEYLEKALN ou,

KPVSLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCI
DPKLKWIQEYLEKALNKRFKM ou.

25 MKPVSLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQV
CIDPKLKWIQEYLEKALNKRFKM.

4. Chemokine SDF-1 ou molécule dérivée de SDF-1 pour la prévention et/ou pour le traitement d'une infection par un rétrovirus VIH, caractérisée en ce qu'elle répond à la séquence d'acides aminés ci-dessous ou en ce qu'elle est contenue dans cette séquence ou encore en ce qu'elle la contient :

KPVSLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCI
DPKCLKWIEYLEKALN

ou en ce qu'elle est sélectionnée parmi le groupe des séquences illustrées aux figures 6A et 6B.

5 5. Chemokine SDF-1 ou molécule dérivée de SDF-1 pour la prévention et/ou pour le traitement d'une infection par un rétrovirus VIH pendant la phase asymptomatique de l'infection ou pour la diminution de la charge virale chez un hôte infecté par un rétrovirus VIH.

10 6. Chemokine SDF-1 ou molécule dérivée selon la revendication 5, pour la prévention et/ou le traitement d'une infection par un rétrovirus VIH pendant la phase asymptomatique de l'infection ou pour la diminution de la charge virale chez un hôte infecté par un rétrovirus VIH, caractérisée en ce qu'elle est codée par un enchaînement de nucléotides contenu dans la séquence de nucléotides représentée à la figure 5.

15 7. Chemokine SDF-1 ou molécule dérivée de SDF-1 selon l'une quelconque des revendications 5 ou 6 pour la prévention et/ou le traitement d'une infection par un rétrovirus VIH pendant la phase asymptomatique de l'infection ou pour la diminution de la charge virale chez un hôte infecté par un rétrovirus VIH, caractérisée en ce qu'il s'agit du
20 produit d'expression dans une cellule eucaryote d'une séquence d'ADNc contenue dans l'enchaînement représenté à la figure 5.

8. Polypeptide caractérisé en ce qu'il est susceptible d'avoir une activité de prévention et/ou de traitement d'une infection par un rétrovirus VIH, et en ce qu'il contient l'une des séquences d'acides aminés
25 suivantes :

KPVSLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCI
DPKCLKWIEYLEKALN ou ;

MKPVSLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQV
CIDPKCLKWIEYLEKALN ou ;

MKPVLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQV
CIDPKLKWIQEYLEKALNKRFKM ou ;

KPVLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCI
DPKLKWIQEYLEKALNKRFKM ou ;

- 5 une séquence d'acides aminés comprenant au moins 50% de résidus d'acides aminés identiques à ceux de la séquence KPVLSYRCPCRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCI DPKLKWIQEYLEKALN, lorsqu'elle est alignée avec cette séquence, à l'exception des séquences d'acides aminés

- 10 MDAKVAVLALVLAALCISDGKPVLSYRCPCRFFESHIARANVKHLKILNT
PNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNK

et

MDAKVAVLALVLAALCISDGKPVLSYRCPCRFFESHIARANVKHLKILNT
PNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNKRLKM.

- 15 9. Polypeptide selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il a les propriétés biologiques de la chemokine SDF-1 humaine.

10. Polypeptide selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il est dépourvu des propriétés biologiques de la chemokine SDF-1 humaine.

11. Polypeptide capable de se lier à un récepteur cellulaire
20 reconnaissant les chemokines CXC, de type CXCR4.

12. Polypeptide selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il appartient à la famille des chemokines.

13. Polypeptide selon la revendication 9 caractérisé en ce qu'il s'agit d'une chemokine SDF1 ou d'une isoforme de SDF1 ou d'un produit
25 d'épissage alternatif du gène codant pour SDF1.

14. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications 8 à 13, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une molécule dérivée de SDF-1 par substitution de la séquence C-terminale par une séquence d'acides aminés hétérologue.

15. Polypeptide dérivé d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 8 à 14, ou dérivé de SDF-1 par substitution d'au moins un acide aminé au sein dudit polypeptide ou de SDF-1 par au moins un autre acide aminé.

5 16. Polypeptide selon la revendication 15 caractérisé en ce qu'il comprend entre un et dix acides aminés substitués.

17. Polypeptide dérivé d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 8 à 14, ou dérivé de SDF-1, par délétion d'une séquence comprise entre un à huit résidus de la partie N-terminale ou de la
10 chemokine SDF-1, notamment choisi parmi les séquences illustrées aux figures 6A et 6B.

18. Séquence de nucléotides codant pour une chemokine SDF-1 ou pour une molécule dérivée de SDF-1 selon l'une quelconque des revendications 8 à 14.

15 19. Séquence de nucléotides choisie parmi :

- l'enchaînement de nucléotides correspondant aux nucléotides 144 à 344 de la séquence représentée à la figure 5 ou,

- l'enchaînement de nucléotides correspondant aux nucléotides 144 à 359 de la séquence représentée à la figure 5 ou,

20 - une séquence de nucléotides contenue dans l'enchaînement représenté à la figure 5 et codant pour une chemokine SDF-1 ou pour une molécule dérivée de SDF-1 selon l'une quelconque des revendications 8 à 14 ou,

- l'enchaînement de nucléotides comprenant les nucléotides 144 à
25 344 de la séquence représentée à la figure 5 et comprenant en outre en position N-terminale, un codon codant pour un résidu méthionine et le cas échéant en position C-terminale une séquence additionnelle de nucléotides.

20. Séquence de nucléotides selon la revendication 19, caractérisée en ce qu'elle est placée sous le contrôle d'éléments de régulation permettant son expression dans des cellules eucaryotes, in vivo ou in vitro.

21. Séquence de nucléotides selon la revendication 20, caractérisée en ce qu'elle est sous le contrôle d'un promoteur inductible.

22. Séquence de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 14 à 21, caractérisée en ce qu'elle est recombinaisonnée avec la séquence codante d'un gène reporteur.

23. Vecteur apte à être administré dans des cellules procaryotes ou eucaryotes, in vivo ou in vitro, caractérisé en ce qu'il contient une séquence de nucléotides hétérologue selon l'une quelconque des revendications 14 à 22 dans des conditions permettant l'expression de ladite séquence hétérologue dans une cellule in vivo ou in vitro.

24. Vecteur choisi selon la revendication 23, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les vecteurs plasmidiques, les vecteurs rétroviraux, les adenovirus, les AAV.

25. Vecteur selon la revendication 24, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur inerte, par exemple un liposome.

26. Vecteur selon l'une quelconque des revendications 23 à 25, caractérisé en ce qu'il est sélectionné parmi les vecteurs capables de transformer des fibroblastes, myoblastes, des cellules stromales ou des cellules hématopoïétiques.

27. Cellule eucaryote recombinaisonnée caractérisée en ce qu'elle contient une séquence de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 18 à 22, dans des conditions permettant l'expression in vitro ou in vivo de ladite séquence.

28. Cellule eucaryote selon la revendication 27, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule humaine ou animale.

29. Cellule eucaryote selon la revendication 28, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi les cellules souches hématopoïétiques, les cellules stromales, les fibroblastes, les myoblastes.

30. Anticorps idiotypiques dirigés contre le récepteur CXCR4.

5 31. Anticorps polyclonaux ou monoclonaux dirigés contre une chemokine SDF-1 ou un polypeptide dérivé de SDF-1 selon l'une quelconque des revendications 8 à 18.

32. Anticorps selon la revendication 31, caractérisés en ce qu'ils sont capables de se lier au récepteur CXCR4.

10 33. Procédé de détection et de quantification d'anticorps présents dans un liquide biologique, dirigés contre une chemokine SDF1 ou une molécule dérivée de SDF1 selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, caractérisé par la mise en contact de ce liquide avec une chemokine SDF1 ou une molécule dérivée et par la détection de la réaction de cette
15 dernière avec les anticorps.

34. Composition à usage thérapeutique, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de principe actif, une chemokine SDF-1 ou une molécule dérivée de SDF-1 selon l'une quelconque des revendications 8 à 18, ou une séquence de nucléotides selon l'une quelconque des revendications
20 18 à 22, ou un vecteur selon l'une quelconque des revendications 23 à 26, ou une cellule recombinante selon l'une quelconque des revendications 27 à 29.

35. Composition caractérisée en ce qu'elle comprend, pour l'administration séparée ou simultanée, une chemokine SDF-1 ou une
25 molécule dérivée selon l'une quelconque des revendications 8 à 18, ou une séquence de nucléotides selon la revendication 22 ou un vecteur selon l'une quelconque des revendications 22 à 26, ou une cellule recombinante selon l'une quelconque des revendications 27 à 29, et un agent actif dans le traitement et/ou la prévention d'une infection due à un
30 rétrovirus VIH choisi parmi les composés ayant une activité anti-

transcriptase inverse, ou anti-protéase virale ou un récepteur CD4 soluble ou une molécule ayant une activité antagoniste vis-à-vis du récepteur CD4 présent sur des lymphocytes d'un patient infecté par un rétrovirus de type VIH, ou un composé actif en immunothérapie, ou un composé actif
5 spécifiquement contre une ou plusieurs infections opportunistes associées à la présence du rétrovirus VIH chez un patient.

36. Composition selon la revendication 35, caractérisée en ce qu'elle contient une ou plusieurs chemokines CXC ou CC.

37. Composition selon la revendication 35, caractérisée en ce que
10 les chemokines sont choisies par exemple parmi RANTES, MIP1- α ou MIP1- β , MCP1.

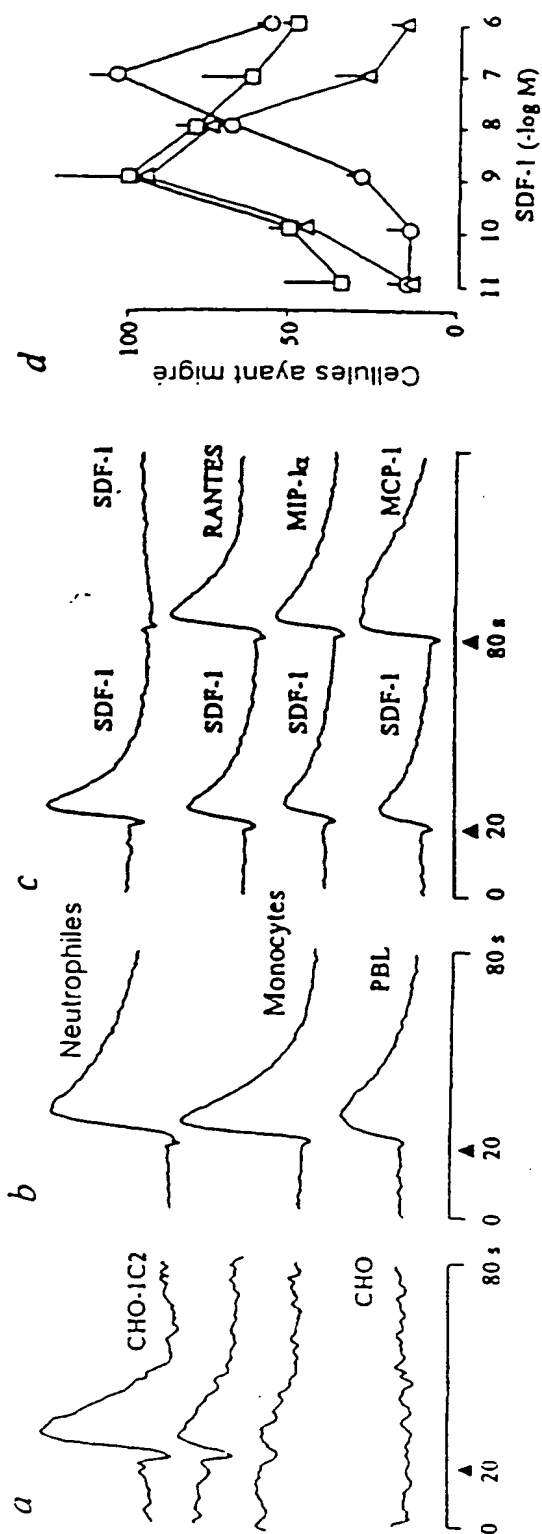
38. Utilisation d'une chemokine SDF-1 ou d'une molécule dérivée selon l'une quelconque des revendications 8 à 18 ou d'une séquence de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 18 à 22 ou d'un
15 vecteur selon l'une quelconque des revendications 23 à 26 ou d'une cellule recombinante selon l'une quelconque des revendications 27 à 29, ou d'une composition selon l'une quelconque des revendications 34 à 37 pour la préparation d'un médicament pour la prévention et/ou le traitement d'une infection par un rétrovirus VIH.

20 39. Utilisation d'une chemokine SDF-1 ou d'une molécule dérivée selon l'une quelconque des revendications 8 à 18 ou d'une séquence de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 18 à 22, ou d'un vecteur selon l'une quelconque des revendications 23 à 26 ou d'une cellule recombinante selon l'une quelconque des revendications 27 à 29,
25 ou d'une composition selon l'une quelconque des revendications 34 à 37 pour la préparation d'un médicament pour le traitement de patients infectés par un rétrovirus VIH et présentant des signes cliniques de SIDA.

40. Utilisation d'une chemokine SDF-1 ou d'une molécule dérivée selon l'une quelconque des revendications 1 à 18 ou d'une séquence de
30 nucléotides selon l'une quelconque des revendications 18 à 22 ou d'un

vecteur selon l'une quelconque des revendications 23 à 26 ou d'une cellule recombinante selon l'une quelconque des revendications 26 à 29, ou d'une composition selon l'une quelconque des revendications 34 à 37, pour la préparation d'un médicament pour le traitement de patients infectés

5 par un rétrovirus VIH, asymptomatiques.



2 / 12

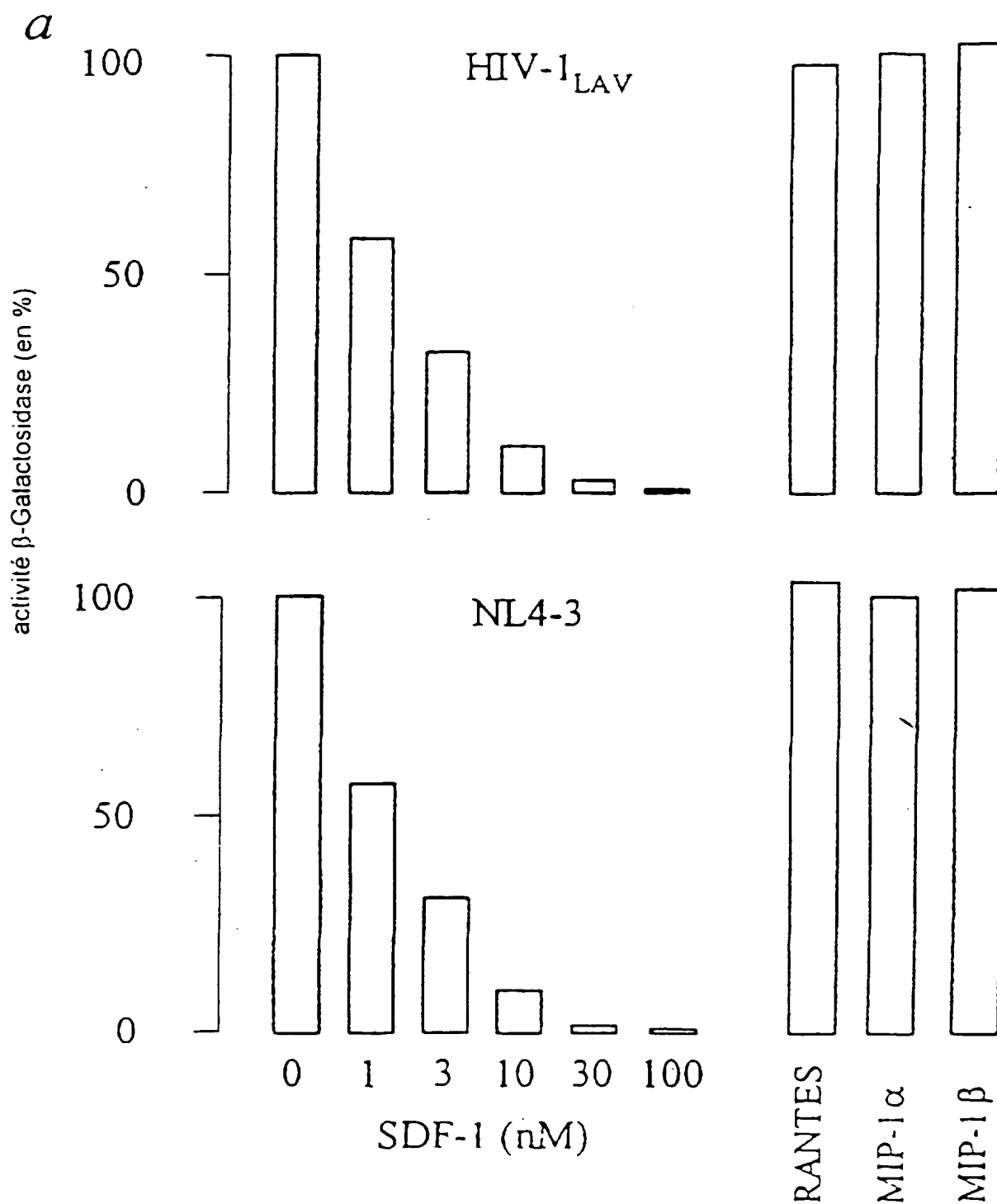
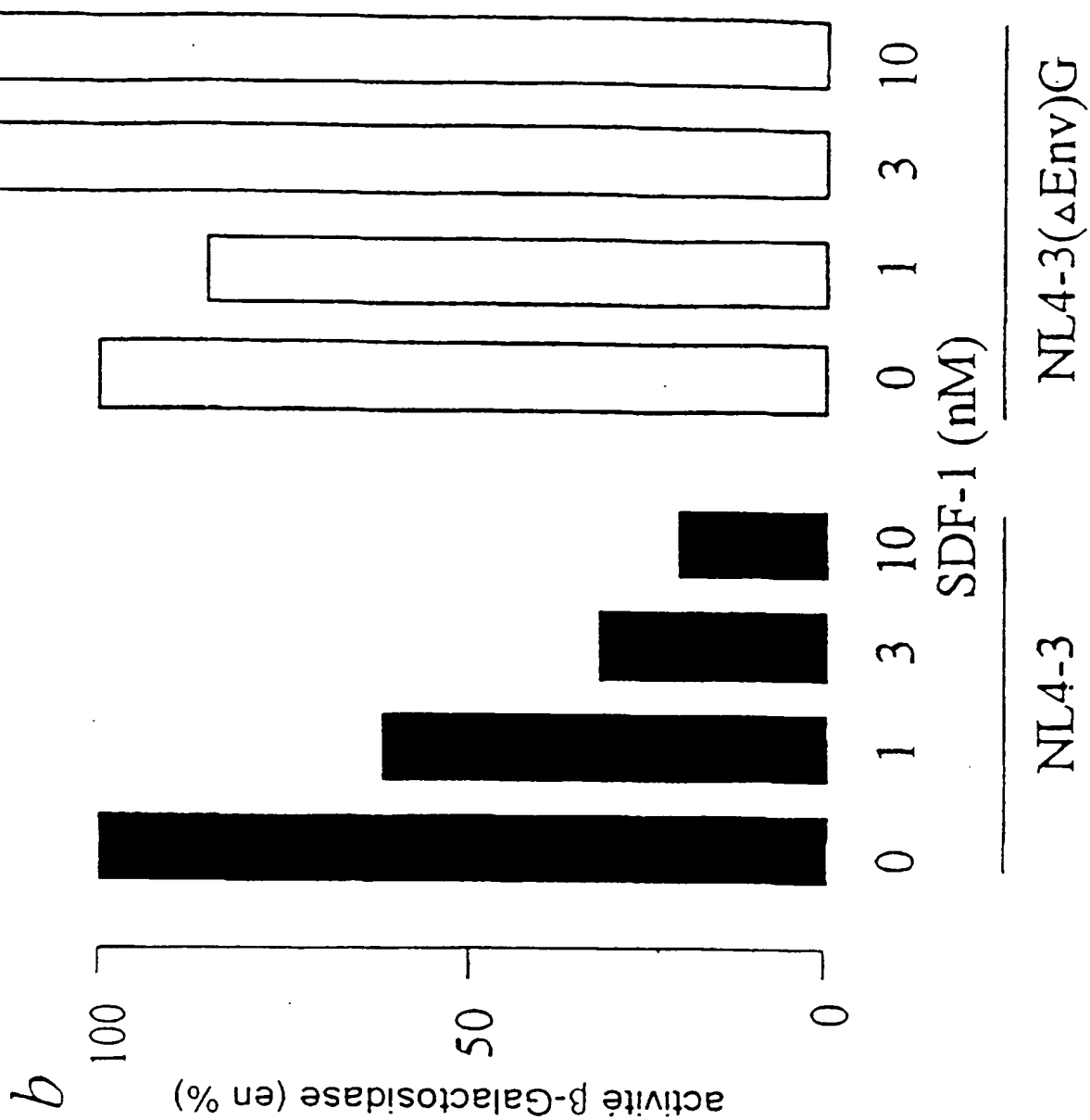
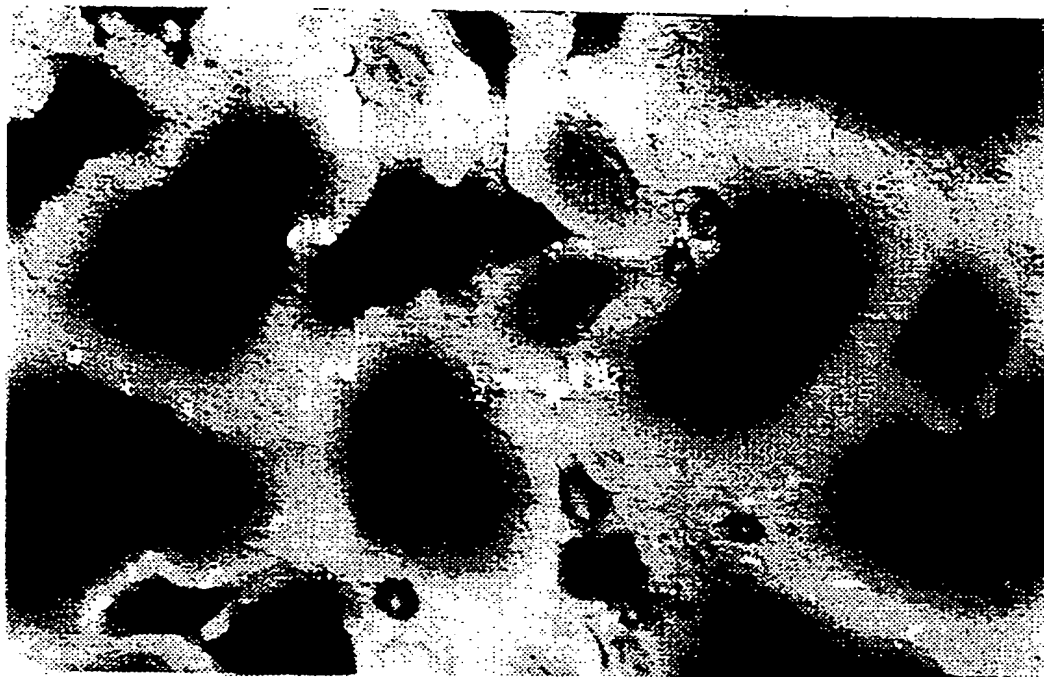


FIGURE 2A

FIGURE 2B



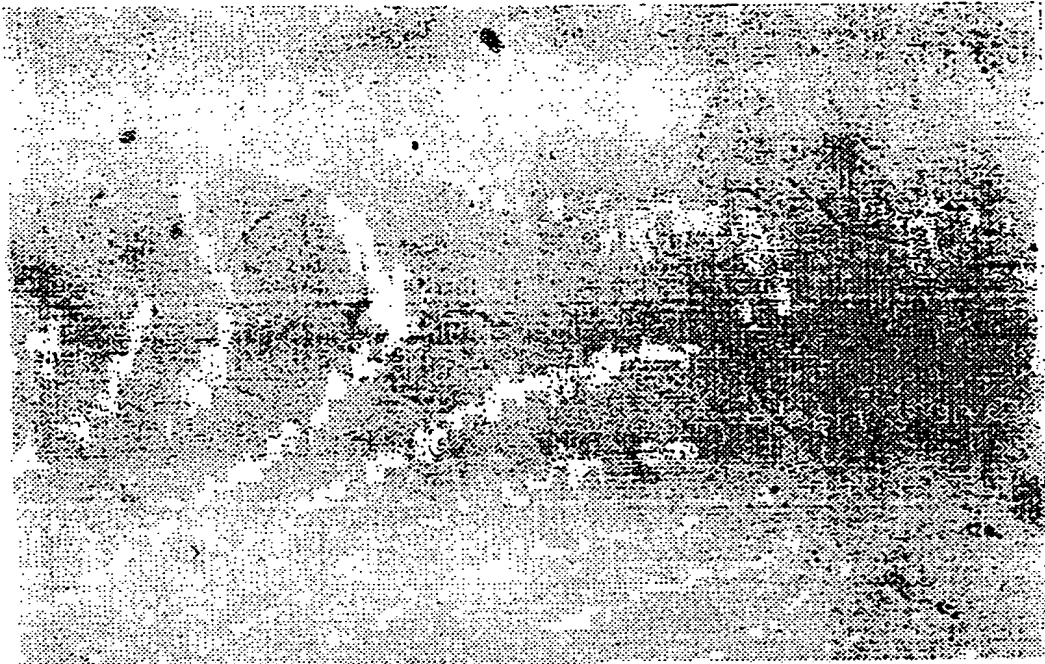
HIV-1_{LAV}



HIV-1_{LAV} + RANTES

FIGURE 3A(a)

CONTROLE



HIV-1_{LAV} + SDF-1

FIGURE 3A(b)

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

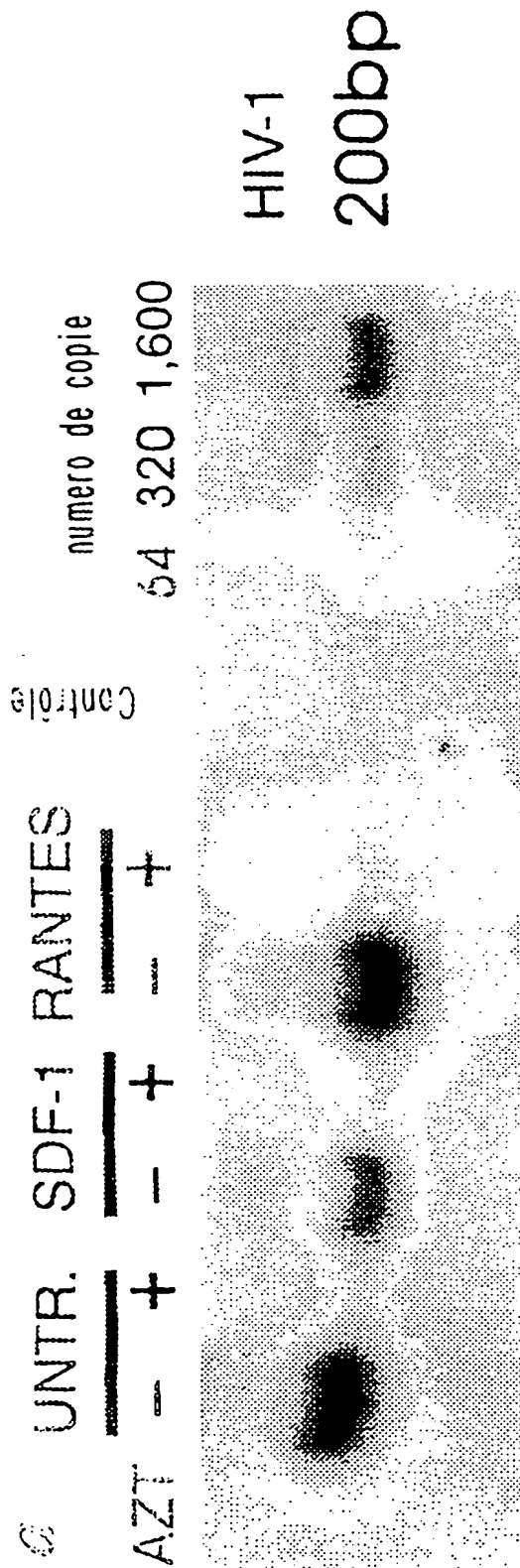


FIGURE 38(a)

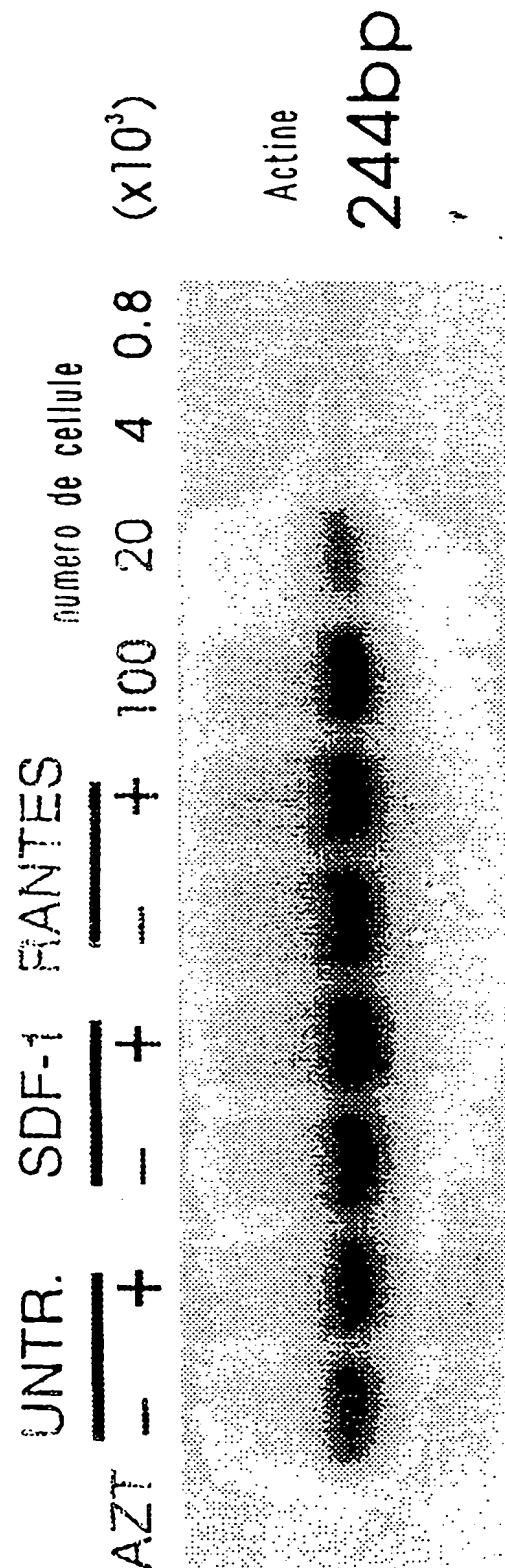


FIGURE 38(b)

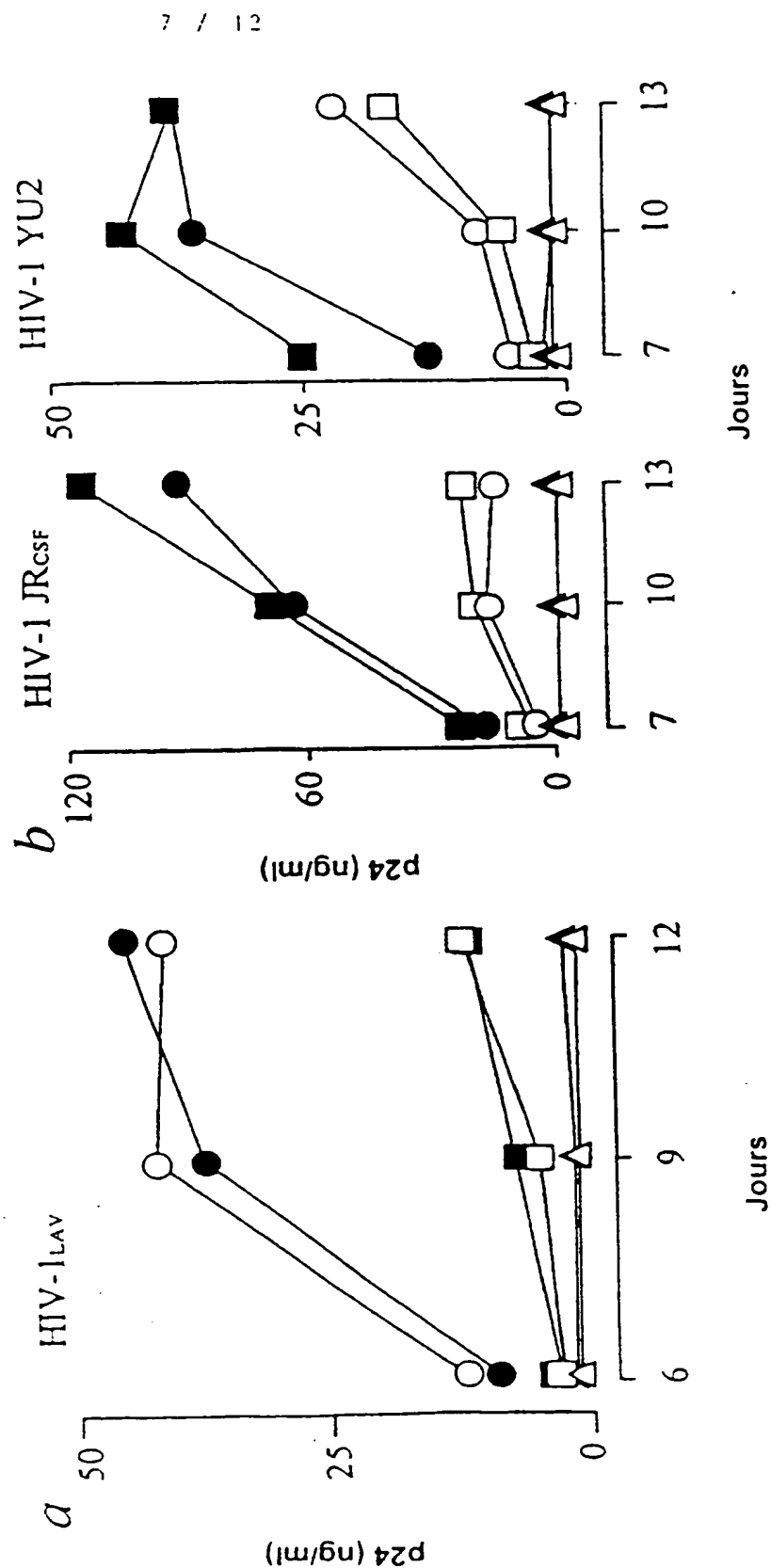


FIGURE 4

8 / 12

"MNAKVVVVLVLVLTALCLSDGKPVSLSYRCP RFFESHVARANV
KHLKILNTPNCALQIVARLKNNNRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNKRFKM"

1 CGCGGCCGCA GCCGCATTGC CCGCTCGGCG TCCGGCCCCC GACCCGCGCT
51 CGTCCGCCCCG CCCGCCCCGCC CGCCCGCGCC ATGAACGCCA AGGTCGTGGT
101 CGTGCTGGTC CTCGTGCTGA CCGCGCTCTG CCTCAGCGAC GGGGAAGCCCCG
151 TCAGCCTGAG CTACAGATGC CCATGCCGAT TCTTCGAAAG CCATGTTGCC
201 AGAGCCAACG TCAAGCATCT CAAAATTCTC AACACTCCAA ACTGTGCCCT
251 TCAGATTGTA GCCCGGCTGA AGAACAACAA CAGACAAGTG TGCATTGACC
301 CGAAGCTAAA GTGGATTGAG GAGTACCTGG AGAAAGCTTT AAACAAGAGG
351 TTCAAGATGT GAGAGGGTCA GACGCCTGAG GAACCCTTAC AGTAGGAGTC
401 CAGCTCTGAA ACCAGTGTTA GGGGAAGGGCC TGCCACAGCC TCCCCTGCCA
451 GGGCAGGGCC CCAGGCATTG CCAAGGGCTT TGTTTTGGAC ACTTTGCCAT
501 ATTTTCACCA TTTGATTATG TAGCAAAATA CATGACATTT ATTTTTCATT
551 TAGTTTGATT ATTCAGTGTC ACTGGCGACA CGTAGCAGCT TAGACTAAGG
601 CCATTATTGT ACTTGCCTTA TTAGAGTGTC TTTCCACGGA GCCACTCCTC
651 TGACTCAGGG CTCCTGGGTT TTGGATTCTC TGAGCTGTGC AGGTGGGGAG
701 ACTGGGCTGA GGGAGCCTGG CCCCATGGTC AGCCCTAGGG TGGAGAGCCA
751 CCAAGAGGGA CGCCTGGGGG TGTCAGGACC AGTCAACCTG GGCAAAGCCT
801 AGTGAAGGCT TCTCTCTGTG GGATGGGATG GTGGAGGGCC ACATGGGAGG
851 TTCACCCCTT TCTCCATCCA CATGGTGAGC CGGGTCTGCC TCTTCTGGGA
901 GGGCAGCAGG GCTACCCTGA GCTGAGGCAG CAGTGTGAGG CCAGGGCAGA
951 GTGAGACCCA GCCCTCATCC CGAGCACCTC CACATCCTCC ACGTTCTGCT
1001 CATCATCTC TGTCTCATCC ATCATCATGT GTGTCCACGA CTGTCTCCAT
1051 GGCCCCGCAA AAGGACTCTC AGGACCAAAG CTTTCATGTA AACTGTGCAC

FIGURE 5A

9 / 12

1101 CAAGCAGGAA ATGAAAATGT CTTGTGTTAC CTGAAAACAC TGTGCACATC
1151 TGTGTCTTGT TTGGAATATT GTCCATTGTC CAATCCTATG TTTTGGTCA
1201 AAGCCAGCGT CCTCCTCTGT GACCAATGTC TTGATGCATG CACTGTTCCC
1251 CCTGTGCAGC CGCTGAGCGA GGAGATGCTC CNTGGGCCCT TTGAGTGCAG
1301 TCCTGATCAG AGCCGTGGTC CTTTGGGGTG AACTACCTTG GTTCCCCCAC
1351 TGATCACAAA AACATGGTGG GTCCATGGGC AGAGCCCAAG GGAATTCGGT
1401 GTGCACCAGG GTTGACCCCA GAGGATTGCT GCCCCATCAG TGCTCCCTCA
1451 CATGTCAGTA CCTTCAAACCT AGGGCCAAGC CCAGCACTGC TTGAGGAAAA
1501 CAAGCATTCA CAACTTGTTT TNGGTTTTTA AAACCCAGTC CACAAAATAA
1551 CCAATCCTGG ACATGAAGAT TCTTTCCCAA TTCACATCTA ACCTCATCTT
1601 CTTCAACCATT TGGCAATGCC ATCATCTCCT GCCTTCCTCC TGGGCCCTCT
1651 CTGCTCTGCG TGTCACCTGT GCTTCGGGCC CTTCCCACAG GACATTTCTC
1701 TAAGAGAACA ATGTGCTATG TGAAGAGTAA GTCAACCTGC CTGACATTTG
1751 GAGTGTTCCC CTTCCACTGA GGGCAGTCGA TAGAGCTGTA TTAAGCCACT
1801 TAAAATGTTT GTCACCTTGC CAAGGCAAGC ACTTGTGGGN NTTGNTTGTT
1851 NTCANTCAGT CTTNCGAATA CTTTTTCCCC TTGATAAAGA CTCCAGTTAA
1901 AANAAATTTT AATGAAGAAA GTGGAAACAA GGAAGTCAAA GCAAGGAAAC
1951 TATGTAACAT GTAGGAAGTA GGAAGTAAAT TATAGTGATG TAATCTTGAA
2001 TTGTAACCTGT TCTTGAATTT AATAATCTGT AGGGTAATTA GTAACATGTG
2051 TTAAGTATTT TCATAAGTAT TTCAAATTGG AGCTTCATGG CAGAAGGCAA
2101 ACCCATCANC AAAAATTGTC CCTTAAACAA AAATTAAAAT CCTCAATCCA
2151 GCTATGTTAT ATTGAAAAAA TAGAGCCTGA GGGATCTTTA CTAGTTATAA
2201 AGATACAGAA CTCTTTCNAA ACCTTTTGAA ATTAACCTCT CACTATACCA
2251 GTATAATTGA GTTTTCAGTG GGGCAGTCAT TATCCAGGTA ATCCAAGATA

FIGURE 5B

2301 TTTTAAAATC TGTCACGTAG AACTTGGATG TACCTGCCCC CAATCCATGA
2351 ACCAAGACCA TTGAATTCTT GGTGAGGAA ACAAACATGA CCCTAAATCT
2401 TGACTACAGT CAGGAAAGGA ATCATTCTTA TTTCTCCTCC ATGGGAGAAA
2451 ATAGATAAGA GTAGAACTG CAGGGNAAAA TTATTGNGAT AACAAATTCCT
2501 CTAATAACAA TCAGCTCCTT CCTGGAGACT GCCCAGCTAA AGCAATATGC
2551 ATTTAAATAC AGTCTTCCAT TTGNAAGGGA AAAGTCTCTT GTAATCCGAA
2601 TCTCTTTTTG GTTTCGAACT GCTAGTCAAG TCGTCCACG AGCTGTTTAC
2651 TAGGGATCCC TCATCTGTCC CTCCGGGACC TGGTGCTGCC TCTACCTGAC
2701 ACTCCCTTGG GCTCCCTGTA ACCTCTTCAG AGGNCCTCGC TGCCAGCTCT
2751 GTNTCAGGAC CCAGAGGAAG GGGNCAGAGG CTCGTTGACT GGCTGTGTGT
2801 TGGGATTGAG TCTGTGCCAC GTGTTTGTGC TGTGGTGTGT CCCCTCTGTC
2851 CAGGCACTGA GATACCAGCG AGGAGGCTCC AGAGGGCGCT CTGCTTGTTA
2901 TTAGAGATTA CCTCCTGAGA AAAAAGGTTC CGCTTGAGC AGAGGGGCTG
2951 AATAGCAGAA GGTGACACCT CCCCCAACCT TAGATGTTCT AAGTCTTTCC
3001 ATTGGATCTC ATTGGACCCT TCCATGGTGT GATCGTCTGA CTGGTGTAT
3051 CACCGTGGGC TCCCTGACTG GGAGTTGATC GCCTTTCCCA GGTGCTACAC
3101 CCTTTTCCAG CTGGATGAGA ATTTGAGTGC TCTGATCCCT CTACAGAGCT
3151 TCCCTGACTC ATTCTGAAGG AGCCCCATTC CTGGGAAATA TTCCCTAGAA
3201 ACTTCAAAT CCCCTAAGCA GACCACTGAT AAAACCATGT AGAAAATTTG
3251 TTATTTTGNA ACCTCGCTGG ACTCTCAGTC TCTGAGCAGT GAATGATTCA
3301 GTGTAAATG TGATGAATAC TGTATTTTGT ATTGTTTCAA TTGCATCTCC
3351 CAGATAATGT GAAATGGTC CAGGAGAAGG NCAATTCCTA TACGCAGNGT
3401 GCTTTAAAAA ATAAATAAGA AACAACTCTT TGAGAAACAA CAATTTCTAC
3451 TTTGAAGTCA TACCAATGAA AAAATGTATA TGCATTATA ATTTTCCTAA
3501 TAAAGTTCTG TACTCAAATG TAAAAA AAAA AAAAAA A

FIGURE 5C

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

FIGURE 6A

12 / 12

IP10H1	KPVLSYR	CPC	ISISNQPVNPRSLEKLEIIIPASQFCPRVEIIATMKKGEKACINPESKAIKNLLKAVSKEMSKRSP
IP10H2	KPVLSYR	CPC	REFESH VNPRSLEKLEIIIPASQFCPRVEIIATMKKGEKACINPESKAIKNLLKAVSKEMSKRSP
IP10	VPLSRTVR	CTC	ISISNQPVNPRSLEKLEIIIPASQFCPRVEIIATMKKGEKACINPESKAIKNLLKAVSKEMSKRSP
GROH1	KPVLSYR	CPC	LQTLQG IHPKNIQHILKILN <u>TPNCAQTEVIATLKN</u> .GRKACINPASPIVKKIIIEKMLNSDKSN
GROH2	KPVLSYR	CPC	REFESH IHPKNIQHILKILN <u>TPNCAQTEVIATLKN</u> .GRKACINPASPIVKKIIIEKMLNSDKSN
GRO	ASVATELR	CQC	LQTLQG IHPKNIQSVNVKSPGPHCAQTEVIATLKN.GRKACINPASPIVKKIIIEKMLNSDKSN
IL8H1	KPVLSYR	CPC	IKTYSK FHPKFIKELRVIE <u>TPNCANTEIIVKLSD</u> GRELCCLDPKENWVQRVVEKFLKRAENS
IL8H2	KPVLSYR	CPC	REFESH FHPKFIKELRVIE <u>TPNCANTEIIVKLSD</u> GRELCCLDPKENWVQRVVEKFLKRAENS
IL-8	SAKELR	CQC	IKTYSKPFHPKFIKELRVIESGPHCANTEIIVKLSD.GRELCCLDPKENWVQRVVEKFLKRAENS

FIGURE 6B

PCT/FR 97/01402

IPC 6	C12N15/19	C12N15/85	C12N15/86	C12N15/88	C12N5/10
	C1201/68	C07K14/52	C07K14/715	C07K14/73	C07K16/24
	C07K16/28	A61K38/17	A61K38/19	A61K48/00	G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K C12N C12O A61K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	TASHIRO K. ET AL.: "Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins" SCIENCE, vol. 261, 30 July 1993, pages 600-603, XP002027998 cited in the application see the whole document ---	1-7, 11, 18
X	EP 0 657 468 A (ONO PHARMACEUTICAL CO) 14 June 1995	1-13, 18-29, 31, 33, 34, 38-40
Y	see the whole document ---	35-37

-/--

☒ Patent family members are listed in annex

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention.

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

3 document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 December 1997

Date of mailing of the international search report

29/12/1997

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P B 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer _____

Kania, T

C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	<p>FENG Y. ET AL.: "HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor" SCIENCE, vol. 272, 10 May 1996, pages 872-877, XP002027999 cited in the application * the whole document, preferably page 873, figure 1*</p>	30
Y	<p>--- DORANZ J. ET AL.: "A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusin cofactors" CELL, vol. 85, no. 7, 28 June 1996, pages 1149-1158, XP002028000 cited in the application * the whole document, preferably page 1155, column 2, paragraph 2*</p>	35-37
A	<p>--- COCCHI F ET AL: "IDENTIFICATION OF RANTES, MIP-1α, AND MIP-1β AS THE MAJOR HIV-SUPPRESSIVE FACTORS PRODUCED BY CD8+ T CELLS" SCIENCE, vol. 270, 15 December 1995, pages 1811-1815, XP000616644 see the whole document</p>	35-40
A	<p>--- GONG J -H ET AL: "ANTAGONISTS OF MONOCYTE CHEMOATTRACTANT PROTEIN 1 IDENTIFIED BY MODIFICATION OF FUNCTIONALLY CRITICAL NH2-TERMINAL RESIDUES" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 181, February 1995, pages 631-640, XP000605169 * see preferably page 633 column 2 paragraph 2, page 636 column 2 paragraph 1*</p>	1-17, 34-40
A	<p>--- MOSER B ET AL: "INTERLEUKIN-8 ANTAGONISTS GENERATED BY N-TERMINAL MODIFICATION" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 268, no. 10, 5 April 1993, pages 7125-7128, XP002017745 see the whole document --- -/--</p>	1-17, 34-40

-C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
A	<p>LOETSCHER M. ET AL.: "CLONING OF A HUMAN SEVEN-TRANSMEMBRANE DOMAIN RECEPTOR, LESTR, THAT IS HIGHLY EXPRESSED IN LEUKOCYTES"</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 269, no. 1, 7 January 1994, pages 232-237, XP000371917 cited in the application see the whole document</p> <p>---</p>	1-40
A	<p>DENG H. ET AL.: "Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1"</p> <p>NATURE, vol. 381, 20 June 1996, pages 661-666, XP002028001 cited in the application see the whole document</p> <p>---</p>	1-40
A	<p>NAGASAWA, T. ET AL.: "Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor"</p> <p>PNAS, U.S.A., vol. 91, no. 6, 15 March 1994, pages 2305-2309, XP002028002 cited in the application see the whole document</p> <p>---</p>	1-40
A	<p>CLARK-LEWIS I ET AL: "STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS OF CHEMOKINES"</p> <p>JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY, vol. 57, no. 5, May 1995, pages 703-711, XP000605180 see the whole document</p> <p>---</p>	1-40
P,X	<p>BLEUL, C. ET AL.: "The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry"</p> <p>NATURE, vol. 382, 29 August 1996, pages 829-832, XP002028003 see the whole document</p> <p>---</p>	1-40
P,X	<p>OBERLIN E. ET AL.: "The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1"</p> <p>NATURE, vol. 382, 29 August 1996, pages 833-835, XP002028004 see the whole document</p> <p>-----</p>	1-40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/01402

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0657468 A	14-06-95	CA 2117953 A	15-04-95
		CN 1110323 A	18-10-95
		JP 7188294 A	25-07-95
		US 5563048 A	08-10-96
<hr/>			

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6	C12N15/19	C12N15/85	C12N15/86	C12N15/88	C12N5/10
	C12Q1/68	C07K14/52	C07K14/715	C07K14/73	C07K16/24
	C07K16/28	A61K38/17	A61K38/19	A61K48/00	G01N33/53

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K C12N C12Q A61K G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	TASHIRO K. ET AL.: "Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins" SCIENCE, vol. 261, 30 juillet 1993, pages 600-603 XP002027998 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-7, 11, 18
X	EP 0 657 468 A (ONO PHARMACEUTICAL CO) 14 juin 1995	1-13, 18-29, 31, 33, 34, 38-40
Y	voir le document en entier ---	35-37
	--- -/--	



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités.

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (elle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

4 décembre 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

29/12/1997

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P. 9, 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Kania, T

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>FENG Y. ET AL.: "HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor"</p> <p>SCIENCE, vol. 272, 10 mai 1996, pages 872-877, XP002027999 cité dans la demande * le document en entier, pref. p.873, fig.1 *</p>	30
Y	<p>--- DORANZ J. ET AL.: "A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusin cofactors"</p> <p>CELL, vol. 85, no. 7, 28 juin 1996, pages 1149-1158, XP002028000 cité dans la demande * le document en entier, pref. p.1155, col. 2, par. 2 *</p>	35-37
A	<p>--- COCCHI F ET AL: "IDENTIFICATION OF RANTES, MIP-1ALPHA, AND MIP-1BETA AS THE MAJOR HIV-SUPPRESSIVE FACTORS PRODUCED BY CD8+ T CELLS"</p> <p>SCIENCE, vol. 270, 15 décembre 1995, pages 1811-1815, XP000616644 voir le document en entier</p>	35-40
A	<p>--- GONG J -H ET AL: "ANTAGONISTS OF MONOCYTE CHEMOATTRACTANT PROTEIN 1 IDENTIFIED BY MODIFICATION OF FUNCTIONALLY CRITICAL NH2-TERMINAL RESIDUES"</p> <p>JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 181, février 1995, pages 631-640, XP000605169 * voir pref. p.633 col.2 par.2, p.636 col.2 par.1 *</p>	1-17, 34-40
A	<p>--- MOSER B ET AL: "INTERLEUKIN-8 ANTAGONISTS GENERATED BY N-TERMINAL MODIFICATION"</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 268, no. 10, 5 avril 1993, pages 7125-7128, XP002017745 voir le document en entier</p> <p>--- -/--</p>	1-17, 34-40

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Categorie	Identification des documents cites, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no des revendications visées
A	<p>LOETSCHER M. ET AL.: "CLONING OF A HUMAN SEVEN-TRANSMEMBRANE DOMAIN RECEPTOR, LESTR, THAT IS HIGHLY EXPRESSED IN LEUKOCYTES"</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 269, no. 1, 7 janvier 1994, pages 232-237, XP000371917</p> <p>cité dans la demande</p> <p>voir le document en entier</p> <p>---</p>	1-40
A	<p>DENG H. ET AL.: "Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1"</p> <p>NATURE, vol. 381, 20 juin 1996, pages 661-666, XP002028001</p> <p>cité dans la demande</p> <p>voir le document en entier</p> <p>---</p>	1-40
A	<p>NAGASAWA, T. ET AL.: "Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor"</p> <p>PNAS, U.S.A, vol. 91, no. 6, 15 mars 1994, pages 2305-2309, XP002028002</p> <p>cité dans la demande</p> <p>voir le document en entier</p> <p>---</p>	1-40
A	<p>CLARK-LEWIS I ET AL: "STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS OF CHEMOKINES"</p> <p>JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY, vol. 57, no. 5, mai 1995, pages 703-711, XP000605180</p> <p>voir le document en entier</p> <p>---</p>	1-40
P,X	<p>BLEUL, C. ET AL.: "The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry"</p> <p>NATURE, vol. 382, 29 août 1996, pages 829-832, XP002028003</p> <p>voir le document en entier</p> <p>---</p>	1-40
P,X	<p>OBERLIN E. ET AL.: "The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1"</p> <p>NATURE, vol. 382, 29 août 1996, pages 833-835, XP002028004</p> <p>voir le document en entier</p> <p>-----</p>	1-40

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs : membres de familles de brevets

Dem: Internationale No

PCT/FR 97/01402

Document brevet cite au rapport de recherche		Date de publication	Membres) de la famille de brevets)	Date de publication
EP 0657468 A		14-06-95	CA 2117953 A	15-04-95
			CN 1110323 A	18-10-95
			JP 7188294 A	25-07-95
			US 5563048 A	08-10-96

